

報告番号 ※ 甲 第 639 号

## 主 論 文 の 要 旨

題 名 脱窒反応の生理化学的研究

氏 名 松 原 輝 男

## 主論文の要旨

報告番号 ※甲第 639 号 氏名 松原輝男

*Pseudomonas denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*, 及び *Pseudomonas stutzeri* の脱窒反応について研究した。これらの種の細菌では、亜硝酸から窒素に至るまでの中間産物として  $N_2O$  が考えられることを、ワールツシルク検圧法とガスクロマトグラフィーを併用して、いろいろな条件で生産されるガスの分析を行った結果により論じた。*Pseudomonas denitrificans* による亜硝酸還元反応の第一の生産物は  $NO$  であることは以前から分っていたので、ここに、*Pseudomonas denitrificans* の脱窒反応経路として、 $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$  のように考えられるようになった。*Pseudomonas denitrificans* の場合と比較しながら、*Alcaligenes faecalis* と *Pseudomonas stutzeri* の脱窒系について研究し、これらも同じように、 $NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$  のように反応を行っていると考えられる結果を得た。

亜硝酸から窒素に至る各反応段階のうち、亜硝酸還元 ( $NO_2^- \rightarrow NO$ ) の段階は、*Alcaligenes faecalis* について研究した。この菌の亜硝酸還元酵素は、*Pseudomonas aeruginosa* と似た、分子量約 90,000 の 4-クローム cd-型のものであることがわかった。この反応段階の性質を、それぞれ菌と比較して論

じた。

*Pseudomonas denitrificans* の  $\text{NO}$ -還元系 ( $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ) の一般的性質をしらべ、これは顆粒結合性の酵素系であることがわかった。顆粒結合性であるために、その実体は分らなかったが、*Alcaligenes faecalis* の  $\text{NO}$ -還元酵素系をしらべたところ、本質的にはやはり顆粒結合性であるが、音波破壊法によって細胞を壊した抽出液の可溶性分画に、いくぶん存在していることがわかり、この酵素のより詳細な研究のみとうしをつけた。

最後の  $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  の反応段階は、細胞を破壊すると、その活性が全くみられなくなり、結局、亜硝酸からは  $\text{N}_2\text{O}$  しか生産されない。このような性質を有するため、最も研究が困難であることは、3種の細菌について同様であった。もつはら生菌においてこの反応段階の性質はしらべられた。

*Pseudomonas denitrificans* において、 $\text{NH}_2\text{OH}$  と亜硝酸が反応して  $\text{N}_2\text{O}$  を生産する反応を解析し、 $\text{NH}_2\text{OH}$  は正常な脱窒反応には無関係であると結論できる結果を得た。

*Alcaligenes faecalis* や *Pseudomonas stutzeri* では、 $\text{NH}_2\text{OH}$  が生産されるガスの  $\text{N}$ -源になるどころではなく、正常な脱窒反応即ち亜硝酸還元に対して阻害効果をもつ。これは、亜硝酸還元酵素の違いを反映しているのではないかと考えられた。すなわち、*Pseudomonas denitrificans* の

亜硝酸還元酵素は銅タンパク質型であるが故に、 $\text{NH}_2\text{OH}$  を代謝できるが、*Alcaligenes faecalis* や *Pseudomonas stutzeri* のそれは、4+7ロー4 cd-型で、そのような酵素をもつものは  $\text{NH}_2\text{OH}$  を代謝できない。これらのことを比較生化学的観点から論じた。

$\text{N}_2\text{O}$  で嫌氣的に生育した *Pseudomonas denitrificans* の脱窒反応活性及び、いくつかの電子伝達系成分の含量について、他のいろいろな条件で生育した菌のそれらと比較研究した。 $\text{N}_2\text{O}$  で生育した菌には、高い  $\text{N}_2\text{O}$  還元活性があり、亜硝酸及び  $\text{NO}$  還元活性はむしろに低かった。また、 $\text{N}_2\text{O}$  で生育した菌には、硝酸で生育した菌の約3倍と2倍もの4+7ロー4 C-553と4+7ロー4 C-552をもっていた。これらから、 $\text{N}_2\text{O}$ -還元系に関与する可能性などについて論じた。

最後に、これらの研究から、あらたに出てきた、いくつかの興味ある問題点を示した。

■ ・ 本 題

# 主 論 文

脱窒反応の生理化学的研究

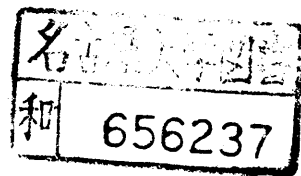
松 原 輝 男

## 脱窒反応の生理化学的研究

松原輝男 (名古屋大学理学部生物学教室)

## も く じ

I	はじめに	2
II	材料と方法概説	5
III	亜硝酸からのガス生産反応	8
IV	亜硝酸から窒素に至る各反応 段階の性質	22
V	NH <sub>2</sub> OH の効果	34
VI	いろいろな条件下で生育した 菌における脱窒反応と電子伝達系成分	41
VII	むすび	51
	分 献	54



## I はじめに

1886年のGayonとDupetit<sup>(1)</sup>による脱窒反応についての古典的な実験以来、現在に至るまでなされた多くの研究<sup>(2)</sup>により、脱窒反応を行うものとして、*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*などに属する各種の微生物が知られている。いずれも嫌気的条件下でのみ、硝酸あるいは亜硝酸を還元し、 $N_2$ あるいは $N_2O$ を放出する。 $N_2$ に至るまでの反応中間生成物についての研究は、いくつかの種類の微生物でなされてきた。硝酸が還元されて亜硝酸が生産される段階については、多くの研究により疑問をはさむ余地はないが、亜硝酸から $N_2$ に至るまでの反応については、少なくとも三種類の反応経路が報告されている。われわれの研究室では、*Pseudomonas denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*及び*Pseudomonas stutzeri*の脱窒反応の研究において、いずれもFig.1のScheme 1のように考えられている。

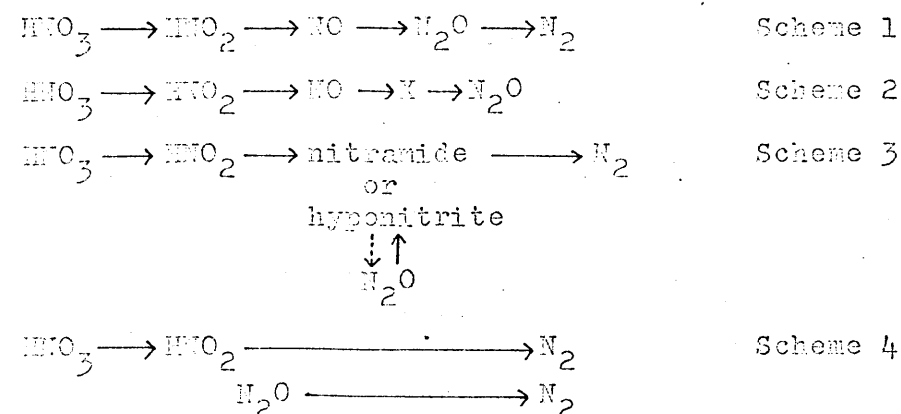


FIG.1 今までに報告された、各種の脱窒菌による脱窒反応経路  
 —→ は酵素的反応      - - - -> 非酵素的反応

RennerとBecker<sup>(3)</sup>によると、*Corynebacterium nephridii*は $N_2$ を生産せず $N_2O$ までだが、 $NO$ と $N_2O$ の間に何らかのN-化合物を考えているようである (Fig.1のScheme 2)。Allenとvan Niel<sup>(4)</sup>による*Pseudomonas stutzeri*の研究では、 $N_2O$ は脱窒反応の中間産物ではないとして、nitramideやhyponitriteを考えている (Fig.1のScheme 3)。SacksとBarker<sup>(5)</sup>による*Pseudomonas denitrificans*の脱窒反応の研究においても、 $N_2O$ はbypassであるとしている。PichinotyとD'Ornano<sup>(6)</sup>による*Micrococcus denitrificans*の研究でも、やはり、 $N_2O$ を中間産物としていない (Fig.1のScheme 4)。われわれの研究室では、土壌から分離され、

後に *Pseudomonas denitrificans* と同定された菌による脱窒反応の研究が、岩崎・森<sup>(7)</sup>により報告されて以来、硝酸、亜硝酸から  $N_2$  に至る反応中間産物の研究や、これらの反応と関連した様々な酵素系の研究がなされ、報告されてきた<sup>(8~25)</sup>。その一連の研究の中で、筆者が興味をもって担った部分は、*Pseudomonas denitrificans* による脱窒反応の中間産物に関する問題、特に  $N_2O$  の生成とその役割及びその酵素系の性質についてであった<sup>(15, 17~20)</sup>。また、*Alcaligenes faecalis* と *Pseudomonas stutzeri* による脱窒反応系の性質と比較<sup>(23, 24)</sup>、及びいろいろな条件下で生育した菌の性質とその比較研究であった<sup>(19, 24)</sup>。これらについて得られた知見をまとめると同時に、さらに発展されるべき問題について考察するのが小論の目的である。

## II 材料と方法概説

*Pseudomonas denitrificans*。条件的嫌気性細菌で、最初に岩崎・森<sup>(7)</sup>により、土壌から分離され、後に、*Pseudomonas denitrificans* と同定された<sup>(13)</sup>。しかし、Ambler, R. P. によると、これは *Pseudomonas* ではなくて、*Alcaligenes* か *Achromobacter* であるということだが、まだはっきりしていないので、*Pseudomonas denitrificans* で通しておく。

*Alcaligenes faecalis* (IAM 1015)<sup>(26)</sup>。Bergey's Manual によると、*Alcaligenes* は好気性細菌である。硝酸から亜硝酸の生産がある場合もない場合もあるということだが、少なくとも脱窒細菌であることは知られていなかった。しかし、われわれの研究により<sup>(23, 24)</sup>、この菌もまた、条件的嫌気性細菌で脱窒菌であることがわかった。

*Pseudomonas stutzeri* (ATCC 17641) = van Niel 株。条件的嫌気性細菌で、脱窒菌として有名な種である。前記二種と違って嫌氣的に硝酸で生



育させると、硝酸で生育する時期と、その生産物である亜硝酸で生育する時期がはっきり分れ、diauxic growthが観察される<sup>(27)</sup>。この菌の脱窒反応については、Allenとvan Niel<sup>(4)</sup>が報告しているが、比較のために、我々もこの細菌の脱窒反応の性質のいくつかを調べた。

上記三種の細菌は、いずれも、Na-acetate 5g, dried yeast extract 1g, NaCl 0.1g, polypeptone 7.5g, meat extract 5g, heavy metal solution 0.1 ml, H<sub>2</sub>O 1l の組成の、pH 6.8 に調製した培地を使い、30°C で生育させた。実験に供した細胞は、たいていの場合、定常期の初期のものであった。KNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub> を与える場合は、1l の培地あたり、それぞれ 5g, 2g を加えた。

いろいろな培養条件で生育させた細菌の性質の研究には、Table I にかかげた培養法で培養した細菌を用いた。

各種のガスの定性・定量分析はもっぱら、ワールブルグ検圧法とガスクロマトグラフィー

Table I 細菌のいろいろな培養条件.

		Electron acceptor	Condition
Anaerobic growth	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -anaerobic	KNO <sub>3</sub>	Static-culture under gas phase of air (deep-culture) or Ar <sup>(2)</sup>
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -anaerobic	NaNO <sub>2</sub> <sup>1)</sup>	Static-culture under gas phase of Ar <sup>(2)</sup>
	N <sub>2</sub> O-anaerobic	H <sub>2</sub> O	Shaking culture under gas phase of N <sub>2</sub> O <sup>(2)</sup>
Aerobic culture	Low-aerobic	O <sub>2</sub>	Shaking culture under gas phase of air.
	High-aerobic	O <sub>2</sub>	Aeration with a compressor (6 l air/min/1 medium)

1) NaNO<sub>2</sub> 水溶液は別に滅菌し、接種する際に培地に加えた。

2) ガス交換の必要と安全のために、コップついた丸底フラスコを用いた。ガスの純度は99%以上であった。

を併用して行なっている。この両者の方法による定量値は10%以内の誤差で合致する。ガスクロマトグラフィーで分析する場合には、分析条件によって多少異なるが、一種類のガスの増減が、送り込まれるサンプル中において数μl はないと測定誤差が増大する。これは、ワールブルグ検圧法による測定値が、20~30 μl 以上の変化をしている場合に、ガスクロマトグラフィーと併用できることを意味する。

このあたりが採用されている方法による測定  
の限界であった。ガスクロマトグラフィーに  
は、シノカゲルとモレキュラーシーフ13Xを、  
実験の必要に応じて、いろいろな測定条件を  
定めておいて使いわけた<sup>(15,17,18)</sup>。

### III 亜硝酸からのガス生産反応<sup>(15,23)</sup>

*Pseudomonas denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*,  
*Pseudomonas stutzeri* のいずれの場合も、生菌に  
よる亜硝酸還元のエレクトロドナーとして、乳酸は  
効果的である。*Pseudomonas denitrificans* の場合  
は、Fig. 2-a~cに示すごとく、このふつうの  
脱窒条件を与えた時のガス生産物の分析によ  
り、窒素の生成に先んじてまず  $N_2O$  が多量に  
放出され、後に一度放出された  $N_2O$  はほとん  
ど完全に  $N_2$  にまで還元されることが明らかにな  
った<sup>(15)</sup>。*Alcaligenes faecalis* と *Pseudomonas stutzeri*  
では、このようなガス放出のパターンはみら  
れず、亜硝酸から生産されるガスは、ほとん

ど全部  $N_2$  であった (Fig. 2-d)<sup>(23)</sup>。 $N_2$  に至るまで  
のいく段階かの反応系に、いろいろな条件が  
複雑に関連しあった結果として、 $N_2O$  が放出  
されたりされなかったりすることが考えられ  
る。この亜硝酸からのガス生産反応系に、い  
ろいろな物質を作用させることによって、放  
出されるガスの、組成の変化及びその放出パ  
ターンの変化は色々の様相を示し、それらの  
結果から考察すると、これら3種の脱窒菌に  
おいては、亜硝酸から  $NO$ 、 $N_2O$  をへて  $N_2$  が生  
産されると結論されるに至ったのである<sup>(14-18, 20, 23)</sup>。  
これら3種の細菌においてその根拠となる諸  
結果をまとめて比較しながら考察を行う。

*Pseudomonas denitrificans* の場合にみられた、  
乳酸をエレクトロドナーとして、亜硝酸から  $N_2O$  が  
生成され、後にそれは  $N_2$  になるという結果は、  
 $N_2O$  が  $N_2$  生成に重要な役割をもっていること  
を示している。古くは  $N_2O$  が脱窒反応の中間  
産物であると考えられていたが、直接の証拠  
はなかったように思われる。むしろ、比較的

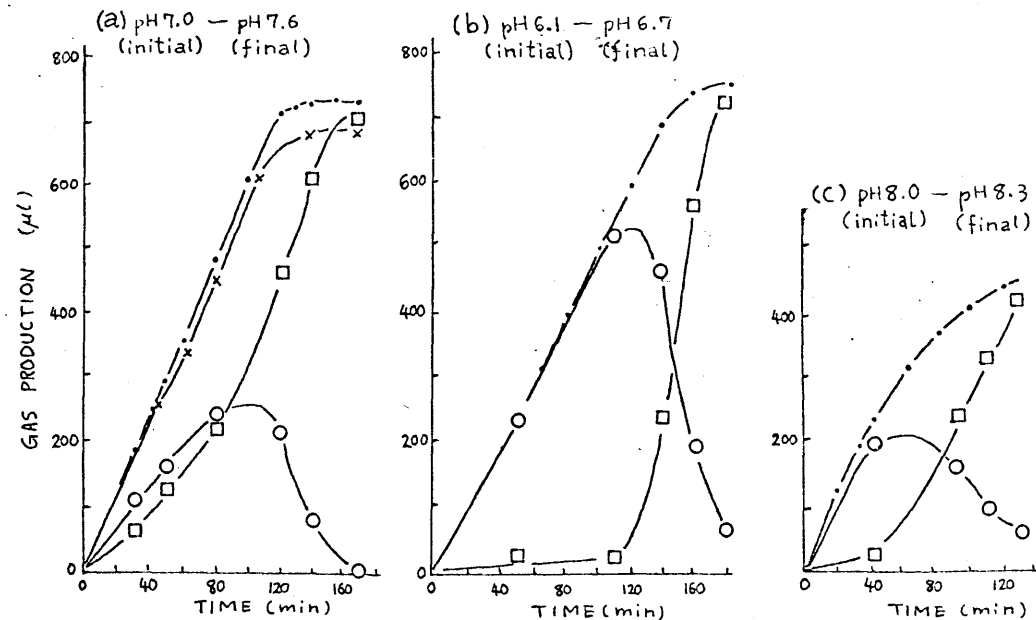


Fig. 2 生菌による乳酸を電子供与体とした亜硝酸酸からのガス生産

(a), (b) & (c) : *Pseudomonas denitrificans*  
(d) : *Alcaligenes faecalis*

ワールツァルク検圧法で測定した全ガス生産量:

—○— フラスコ定数として  $K_{N_2O}$  を使用  
—x— フラスコ定数として  $K_{N_2}$  を使用

N<sub>2</sub>O (—○—) と N<sub>2</sub> (—□—) は、ガスクロマトグラフィーにより定量した。

Main cup :  $\frac{1}{2}$  M phosphate buffer, pH 7.0, 6.1 or 8.0 0.6 ml, resting cell suspension 1.0 ml,  $\frac{1}{2}$  M Na-lactate 0.3 ml,

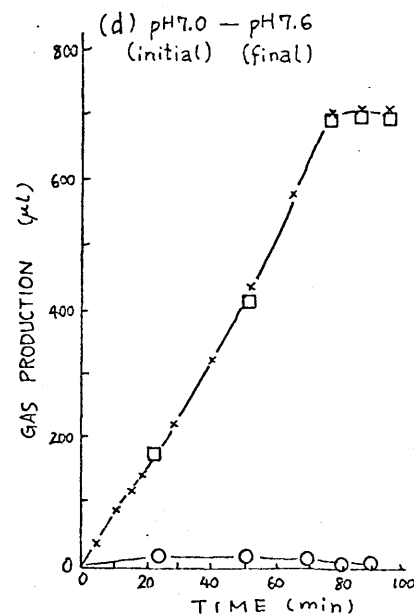
Side arm :  $\frac{1}{5}$  M NaNO<sub>2</sub> 0.3 ml.

Total volume : 6.0 ml,

Center well : 20% KOH 0.2 ml,

Gas phase : He Temp. : 30°C.

Gas chromatography ; Column : Silica Gel 1m.  
Carrie gas : He, Flow rate : 60 ml/min.  
Column temp. : 30°C, Bridge current : 180 mA.



最近まで、N<sub>2</sub>O は副産物である、すなわち N<sub>2</sub>O を通らずに N<sub>2</sub> が生産されるという報告が出ており、広くそう思われていたようである (2)。代りに nitroxyl や nitramide, hyponitrite のようなものが考えられていた。N<sub>2</sub>O が副産物であると結論されている菌は、*Pseudomonas stutzeri*<sup>(4)</sup>, *Pseudomonas denitrificans*<sup>(5)</sup> と *Micrococcus denitrificans*<sup>(6)</sup> で、その証拠としていることは主に阻害剤を使つての実験結果であつた。即ち、「cyanide, azide, 2,4-dinitrophenol により、亜硝酸酸から N<sub>2</sub> の生成は阻害されないが、N<sub>2</sub>O が N<sub>2</sub> になるのは完全に阻害される」というものだつた。しかし、生産されたガスが何であることを確実におさえながら研究を進める手段がまだ発展していなかったこともあつて、水に対する溶解度の違いから N<sub>2</sub>O であるか N<sub>2</sub> かを区別していたにすぎなかつた。後に述べるように、阻害剤の存在の下に亜硝酸酸から生産される、水に対する溶解度が低いガス生産物は NO である可能性もあったのである。

*Pseudomonas denitrificans* と *Alcaligenes faecalis* による、 $N_2O$  から  $N_2$  の反応に対する  $NaN_3$ , KCN, 2,4-dinitrophenol の阻害度は Table II に示した<sup>(15,23)</sup>。これらの生菌による  $N_2O$  から  $N_2$  の生成反応は、lag period の全く認められない速い反応であった (Fig. 3)。また、 $N_2O$  に対するみかけ上のミハイリス定数は、いずれも  $10^{-5}M$  の order でむしろ低い。 $N_2O$  から  $N_2$  の反応を pH 7.0 において 100% 阻害する濃度のこれらの阻害剤の存在下で、亜硝酸から生産されるガスは、(i)  $N_2O$  だけ、(ii)  $NO$  と  $N_2O$ , (iii)  $N_2O$  と  $N_2$  の三つのタイプに分けられる。*Pseudomonas denitrificans* の場合、 $N_2O \rightarrow N_2$  の反応は  $10^{-3}M$  以上の濃度の  $NaN_3$  によって 100% 阻害されるが、この濃度の  $NaN_3$  存在下で亜硝酸からは  $N_2O$  だけが生産される (Fig. 4)。同じように、 $10^{-4}M$  KCN,  $10^{-4}M$  2,4-dinitrophenol の存在下では  $N_2O$  だけが生産された。これらの濃度の阻害剤により、亜硝酸からのガス生産速度はあまり強く阻害されず、KCN, 2,4-dinitrophenol ではいずれも 20% 程度の阻害

Table II 生菌による  $N_2O$  の  $N_2$  への還元反応に対する  $NaN_3$ , KCN と 2,4-dinitrophenol の効果。

$N_2O$  の  $N_2$  への還元は、ガスクロマトグラフィーにより、 $N_2$  の生産量又は  $N_2O$  の減量として測定した。ガスクロマトグラフィーの条件は Fig. 2 に同じ。

Side arm:  $\frac{1}{2}M$  Na-lactate 0.3 ml, Main cup: resting cell suspension 0.5 ml,  $\frac{1}{2}M$  phosphate buffer, pH 7.0 or 7.6, 0.6 ml, inhibitor 0.6 ml, Total vol.: 6.0 ml, Center well: 20% KOH 0.2 ml, Gas phase: 95% He, 5%  $N_2O$ , Temp.: 30°C.

Molar conc.	pH	<i>Ps. denitrificans</i>			<i>Alc. faecalis</i>		
		$NaN_3$	KCN	DNP	$NaN_3$	KCN	DNP
$10^{-2}$	7.0	100			100		
$10^{-2}$	7.5				~100		
$10^{-3}$	7.0	100	100		~100		
$10^{-3}$	7.5				70-80		
$5 \times 10^{-4}$	7.0	99			81		
$10^{-4}$	7.0	48	100	~100	26	100	69
$5 \times 10^{-5}$	7.0	12	95	70		90-95	
$10^{-5}$	7.0	~0	49	24			
$5 \times 10^{-6}$	7.0		9				
$10^{-6}$	7.0		~0				

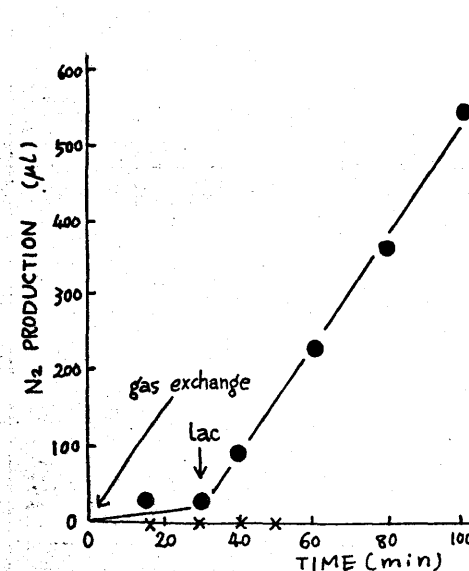


Fig. 3 *Ps. denitrificans* による乳糖を電子供与体とした  $N_2O$  の  $N_2$  へ還元。

実験条件は、inhibitor を与えない以外は、表 II の場合と同じ。pH 7.0。

—●—, —x— はそれぞれ、気相に  $N_2O$  を与えた場合と与えない場合の  $N_2$  生産量。

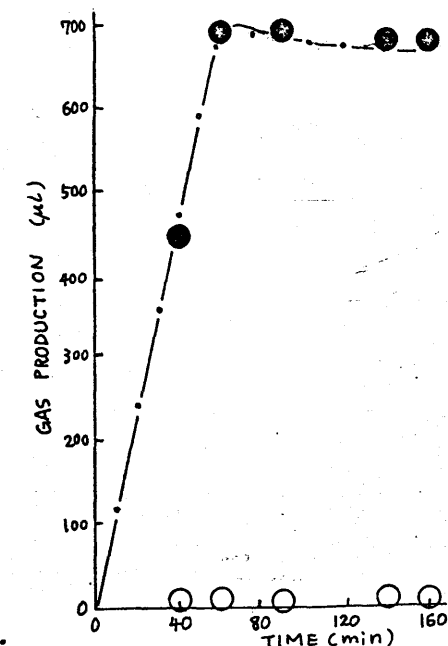


Fig. 4 *Ps. denitrificans* における、亜硝酸からのガス生産反応に対する  $NaN_3$  ( $10^{-2}M$ ) の効果。 $N_2O$  (●) と  $N_2$  (○) はガスクロマトグラフィーで測定。全ガス生産量 (—●—) は検圧法で測定した。 $NaN_3$  は  $10^{-2}M$  与えて他、実験条件は Fig. 2 の場合と同じ。

であり、 $\text{NaN}_3$  の場合はむしろ stimulation がみられた。*Pseudomonas denitrificans* で得られたこれらの結果は、 $\text{N}_2\text{O}$  が亜硝酸から  $\text{N}_2$  に至る中間産物としての役割をもつことを示しているように考えられる。少くとも、 $\text{N}_2\text{O}$  が副産物であると結論するような証拠には全くならないと思われる。

*Alcaligenes faecalis* の場合は<sup>(23)</sup>、*Pseudomonas denitrificans* とはいくぶんちがった性質が、阻害剤の効果にあらわれた。 $10^{-2}\text{M}$  の  $\text{NaN}_3$  存在下で、亜硝酸からのガス生産速度は 50% 阻害され、生産されるガスは  $\text{N}_2\text{O}$  だけであつた。しかし、 $10^{-3}\text{M}$   $\text{NaN}_3$  の場合は、Fig. 5 に示したように、まず大量の  $\text{N}_2\text{O}$  が生産されるが、後に  $\text{N}_2$  になつてしまった。この結果は、反応液の pH が、はじめの 7.0 から終りには 7.6 にまで変化するため、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の反応に対する  $\text{NaN}_3$  の阻害が完全ではなくなつたためと理解された。すなわち、pH 7.0 で阻害が 100% であつたものが、アルカリ性では阻害度が低下したのである（

Table II) 。このような現象がみられるかぎり、反応の遅い時期だけで生産物質の分析を行うと、 $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  の反応は 100% 阻害されるのに、亜硝酸から  $\text{N}_2$  が生産されることになり、 $\text{N}_2\text{O}$  は副産物であるというまちがった結論を出す危険性は、十分注意されなければならない。

*Alcaligenes faecalis* においては、 $10^{-4}\text{M}$  KCN の存在下で亜硝酸からのガス生産速度は、75% と強く阻害され、生産されているガスは  $\text{NO}$  と  $\text{N}_2\text{O}$  であり、 $\text{N}_2$  は全く検出されなかつた (Fig. 6)。

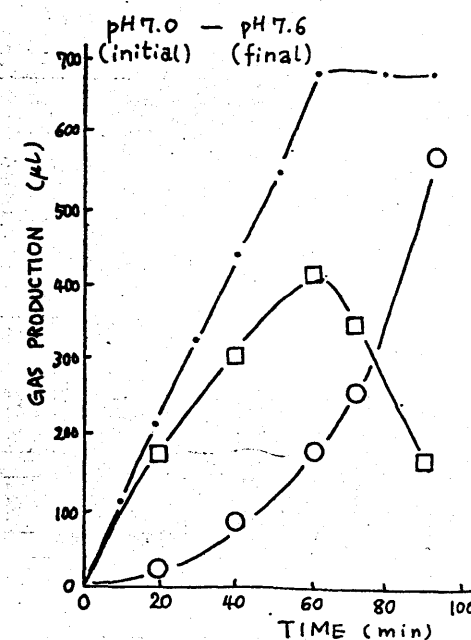


Fig. 5 *Alc. faecalis* の亜硝酸からのガス生産に対する  $\text{NaN}_3$  ( $10^{-3}\text{M}$ ) の効果。

—●— 全ガス生産量 (検圧法測定値)。  
□  $\text{N}_2\text{O}$ , ○  $\text{N}_2$  (ガスクロマトグラフィー定量)。

Main cup: cell suspension 1.0 mL,  
 $\frac{1}{2}\text{M}$  phosphate buffer, pH 7.0, 0.6 mL,  
 $\frac{1}{2}\text{M}$  Na-lactate 0.6 mL,  $10^{-2}\text{M}$   $\text{NaN}_3$  0.6 mL.  
Side arm:  $\frac{1}{5}\text{M}$   $\text{NaNO}_2$  0.3 mL,  
Total volume: 6.0 mL,  
Center well: 20% KOH 0.2 mL,  
Gas phase: He.

ガスクロマトグラフィーの条件は、Fig. 1 に同じ。

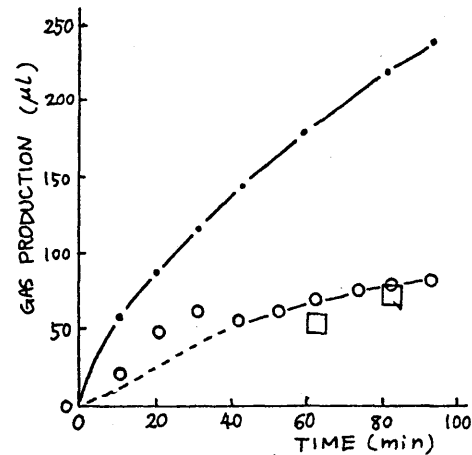


Fig. 6 *Alc. faecalis* の亜硝酸からのガス生産に対する KCN ( $10^{-4}M$ ) の効果。  
 —●— 全ガス生産量 (center well に NO の吸収剤と比の  $KMnO_4$  を入れないで検圧法で測定した)。  
 —○— center well に  $KMnO_4$  を入れた場合の測定値。即ち NO 以外のガスの生産量。  
 □ ガスクロマトグラフによる生産した  $N_2O$  の定量値。  
 $NaN_3$  の代りに KCN を与えた他、実験条件は Fig. 5 に同じ。

この場合のように、  
 もしも生産ガスの分析が溶解度の違いだけによるもので、NO の放出をエッジしなければ、やはり、  
 $N_2O \rightarrow N_2$  の反応が 100% 阻害されるのに、  
 $N_2$  が放出されているというまじがった解釈をする可能性が

ろう。 $N_2$  と NO の水に対する溶解度には、NO と  $N_2O$ 、又は  $N_2$  と  $N_2O$  ほどのちがいはないからである。Allen と van Niel による報告<sup>(4)</sup>で、*Pseudomonas stutzeri* では、 $N_2O \rightarrow N_2$  の反応が完全に阻害される濃度の KCN が存在しても、まだ、亜硝酸からガスは生産されるから、 $N_2O$  は中間産物にはなり得ない」という結論は、この点の誤解ではなかったろうかと疑問をもつ結果をわれわれは得ている。即ち、Table III

に要約したように、*Pseudomonas stutzeri* のガス生産反応の性質は、*Alcaligenes faecalis* の場合と同じように、KCN 存在下で亜硝酸から大量の NO と  $N_2O$  が生産されており、 $N_2$  は検出されなかったし、2,4-dinitrophenol や  $NaN_3$  存在下では、 $N_2O$  しか生産されなかった。これらの結果には、 $N_2O$  が副産物であると結論できる証拠はなかった (Matsubara & Shidara, unpublished experiments)。

2,4-dinitrophenol の効果は、*Alcaligenes faecalis* に対しては弱いもので、亜硝酸からのガス生産速度と  $N_2O \rightarrow N_2$  の反応に対する阻害度は、 $10^{-4}M$  の濃度でそれぞれ 66% と 68% と同じ位であり、結局阻害剤を加えない場合と同じように、亜硝酸からは  $N_2$  しか生産されなかった。

このような諸結果と、後にのべる各反応酵素系の研究から、われわれは、*Pseudomonas denitrificans* も、*Alcaligenes faecalis* と *Pseudomonas stutzeri* の場合も同じように、 $N_2O$  が亜硝酸から  $N_2$  の生産の中間産物と考えてもよからうと結論した。

Table III *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas denitrificans* & *Alcaligenes faecalis* の脱窒反応の性質。

Reaction system	van Niel Strain of <i>Ps. stutzeri</i>	<i>Ps. denitrificans</i>	<i>Alc. faecalis</i>
Intact cells	Lactate - $\text{NO}_2^-$	-	-
	+ $10^{-3}\text{M}$ $\text{NaN}_3$	$\text{N}_2\text{O}$ , $\text{N}_2$	$\text{N}_2$ , ( $\text{N}_2\text{O}$ )
	+ $10^{-3}\text{M}$ $\text{NaN}_3$	Stimulation	50
	+ $10^{-3}\text{M}$ $\text{NaN}_3$	Stimulation	10
	+ $10^{-4}\text{M}$ $\text{KCN}$	20	75
Cell-free Extracts	+ $10^{-4}\text{M}$ $\text{DNP}$	20	68
	$\text{NH}_2\text{OH} - \text{NO}_2^-$	-	No gas production
	Lactate - $\text{NH}_2\text{OH} - \text{NO}_2^-$	-	No gas production
Nitrite-reductase	Lactate - $\text{NO}_2^-$	-	-
NO-reductase			
$\text{N}_2\text{O}$ -reductase			
Reference on gas metabolism.			

これら  $\text{N}_2\text{O}$  に関する研究に先だって、われわれの研究室における *Pseudomonas denitrificans* についての研究で、亜硝酸から  $\text{N}_2$  に至るまでの第一の中間産物は  $\text{NO}$  であろうと考えられていた<sup>(8,14)</sup>。亜硝酸が還元されて最初にできるものが  $\text{NO}$  であり、これが中間産物の一つと考えるには、生菌がこれを生成するということを検出することがまず第一に必要である。*Pseudomonas denitrificans* では、このことは最初に、岩崎らによって報告された<sup>(8)</sup>。すなわち、電子供与体としての乳酸と共に、トルイレンブルーを与えると、この菌は亜硝酸から大量の  $\text{NO}$  を生成した。これはトルイレンブルーが、 $\text{NO}$  より先の反応を阻害するから、 $\text{NO}$  が放出されると理解された。 $\text{NO}$  以外のガスも放出されているが、これは後で見るように  $\text{N}_2\text{O}$  であり、この反応条件では  $\text{N}_2$  は生産されない。トルイレンブルーは  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の反応を強く阻害するからである。亜硝酸還元酵素の研究はその後詳細にわたって進められ、結局、「脱窒酵素」



と名づけられた銅酵素が亜硝酸還元酵素として作用することが確立され、その単離された系における亜硝酸還元の生成物は NO であることが明らかになった<sup>(10,11,13,14,16)</sup>。NO から N<sub>2</sub>O に至る反応についての一般的な研究もなされ<sup>(17)</sup>、それを加えて亜硝酸から N<sub>2</sub> に至る反応は、  
 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$ ,  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  と分けてその酵素系を解析できるようになった。

*Alcaligenes faecalis* の場合は<sup>(23)</sup>、KCN をある濃度で与えた場合に NO の生成がみられ、NO は中間産物になるかもしれないという可能性を示唆した。即ち、NO から N<sub>2</sub>O の反応もまた、KCN によって強く阻害されるから、NO が放出されると考えられた。実際に気相に与えた NO は、N<sub>2</sub>O に速い速度で還元されるし、この反応は KCN によって強く阻害された (Fig. 7)。後で、  
 へべるように、*Alcaligenes faecalis* の亜硝酸還元酵素も精製・結晶化され<sup>(24)</sup>、それによつて触媒される亜硝酸還元の産物は NO であつたし、NO は particulate fraction 又は可溶化された NO 還元

酵素活性をもつ酵素標品によつて N<sub>2</sub>O に変ることとは、NO が中間産物の一つである可能性を支持する結果である。  
 われわれは、以上の結果をもとに、*Pseudomonas denitrificans* も、

*Alcaligenes faecalis* も共に、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  のように反応が進んでいると考え、各段階の酵素系について解析をさらに進め、その反応機構

をより明らかにしてゆこうとしている。

$\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$  の還元酵素は、*Pseudomonas denitrificans* でも *Alcaligenes faecalis* でも単離精製された。

NO 還元酵素は particulate-bound であるために、

*Pseudomonas denitrificans* では可溶化に成功していないが、*Alcaligenes faecalis* では可溶化された。

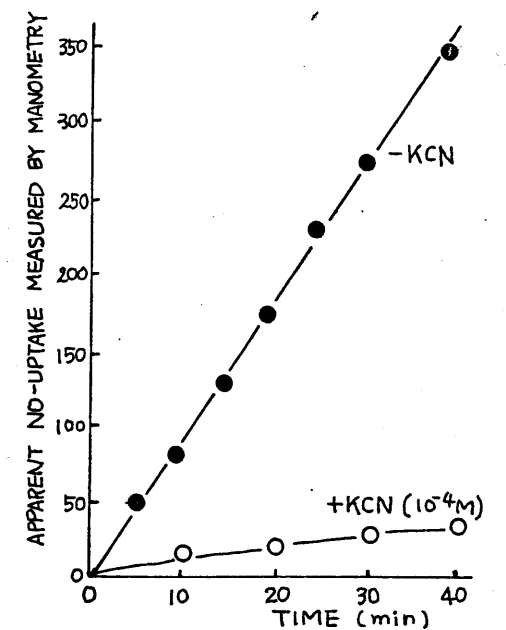


Fig. 7 *Alcaligenes faecalis* による NO 還元と、その KCN による阻害。

検圧法で測定した NO-uptake は、みかけ上の値で、実際は N<sub>2</sub>O が生産物として気相に放出されるので、測定値の 2 倍になる。

Main cup: cell suspension 1.0 ml, 1/2 M phosphate buffer, pH 7.0, 0.6 ml, 10<sup>-3</sup> M KCN 0.6 ml, Side arm: 1/2 M Na-lactate 0.3 ml, Total volume: 6.0 ml, Center well: 20% KOH 0.2 ml, or (N-KOH:N-KCN=1:1) 0.2 ml, Gas phase: 10% NO & 90% He.



しかし、細胞を破壊すると  $N_2O \rightarrow N_2$  の反応は、いずれの菌においても、その活性がみられなくなってしまう。結局、無細胞標品による脱窒反応は  $N_2O$  までしか進まない。以下これらの各段階の酵素系について得られた知見を述べる。

#### IV 亜硝酸から窒素に至る各反応段階の性質。

##### (i) $NO_2^- \rightarrow NO$

前に述べたように、*Pseudomonas denitrificans* の亜硝酸還元酵素は分子量約 140,000 の Cu-protein で、cytochrome c-552 又は cytochrome c-553 が電子供与体となって、亜硝酸を還元し NO を生産する反応を触媒することが、これまでの研究により明らかになっている (See ref. 20)。

*Alcaligenes faecalis* の亜硝酸還元酵素は、同じ反応を触媒するが、Cu-protein ではなく、前に大阪大学のグループの明らかにした *Pseudomonas aeruginosa* の酵素と似ている、分子量約 90,000 の

cytochrome cd-type の酵素であることがわかった (23, 24)。硝酸で嫌氣的に生育した菌を音波で破壊して調製した crude extract で、亜硝酸還元にも効果的な人為的電子供与体は、アスコルビン酸で還元したフェナジンメトサルフェート (ascorbate - PMS) であった。ascorbate - PMS -  $NO_2^-$  反

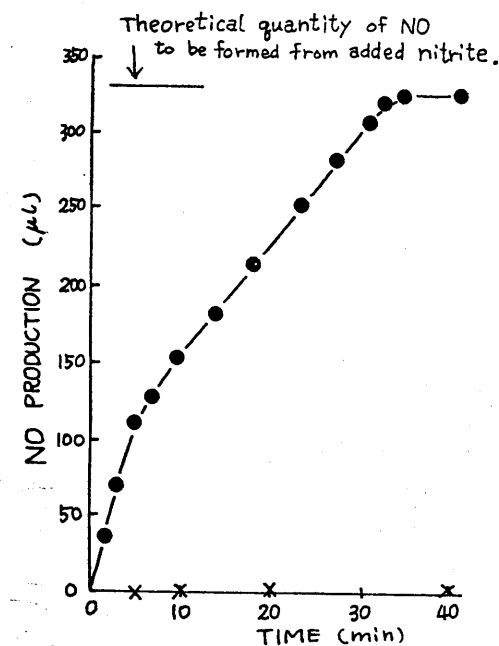


Fig. 8 Cytochrome cd による亜硝酸からの NO 生産。

● — cytochrome cd  
— x — cytochrome c-557(551).

Main cup: cytochrome cd 0.1 ml (0.194 mg) or cytochrome c-557(551), 0.5 M phosphate buffer, pH 7.0, 0.3 ml, 0.05 M  $NaNO_2$ , 0.3 ml,  
Side arm:  $2 \times 10^{-4}$  M Na-ascorbate 0.15 ml,  $2 \times 10^{-3}$  M phenazinemethosulfate 0.15 ml.  
Total volume: 3 ml.  
Center well: 20% KOH 0.2 ml.  
Gas phase: He, Temp.: 30°C

応系を用いて亜硝酸還元酵素活性を解析すると、それは soluble fraction にあり、硫酸分画すると、60~80% 飽和の分画に強く存在した。この分画には、cytochrome cd がひじょうに多く含まれていて、精製すると、結局この cytochrome cd が亜硝酸還元酵素として作用していることが明らかになった (Fig. 8 と 9, Table IV)。

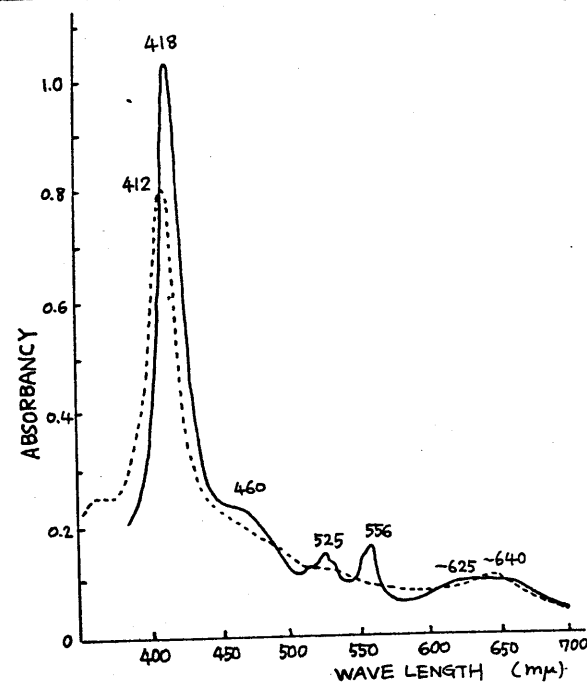


Fig 9 *Alcaligenes faecalis* の cytochrome cd の  
吸収スペクトル  
cytochrome cd の濃度 = 0.3 mg/ml of 0.05M  
phosphate buffer, pH 7.0.  
 $A_{412\text{nm}}^{\text{oxidized}} / A_{280\text{nm}} = 1.15$   
----- 酸化型, — dithionite-還元型.

cytochrome cd の物理  
化学的性質につい  
ては、かなり詳し  
く調べられ報告し  
た<sup>(24)</sup>。それと同時に、  
cytochrome c-557(551)  
も精製し、その性  
質を調べて報告し  
た。その他にも、

*Alcaligenes faecalis* は  
何種類かの cytochrome  
をもっており、

*Pseudomonas aeruginosa*<sup>(29)</sup> と同じように、このう  
ちのどれかが電子伝達体として働いている  
ことが十分考えられるが、この点については  
これから問題として残されている。

*Pseudomonas denitrificans* の亜硝酸還元酵素も、  
*Alcaligenes faecalis* のそれと同じように亜硝酸か  
ら NO の生成を触媒するのに、前者は Cu-protein  
であり、後者は Fe-protein である。タンパク質

としては全く性質がちがうと思われるものが  
同一の機能をもつことはひじょうに興味深い。  
全くちがった触媒様式で同じ結果を生むのか、  
両者の活性中心が同じ機能をもちうるような  
構造をもつのか、このメカニズムについての  
詳細な研究が待たれる。

*Pseudomonas stutzeri* の亜硝酸還元酵素もやはり  
cytochrome cd-type である可能性は兎玉により示  
唆されている<sup>(28)</sup>。

このような亜硝酸還元酵素のちがいは、後  
でのべるように、 $\text{NH}_2\text{OH}$  が亜硝酸と反応して  
 $\text{N}_2\text{O}$  を生産する反応の触媒能力をその細菌が  
持つか否かということに反映されているので  
はないかと考えられる。即ち、 $\text{NH}_2\text{OH} + \text{NO}_2^-$  か  
ら  $\text{N}_2\text{O}$  を生産することのできる細菌の亜硝酸  
還元酵素は Cu-protein-type で、できない細菌  
のそれは cytochrome cd-type であるかもしれない  
ということである。しかし残念ながら脱窒菌  
の亜硝酸還元酵素が Cu-protein であるというの  
は、報告されているうちでは、*Pseudomonas*

*denitrificans* だけで、これもこれからの研究の問題となるべきものと思われる。

## (ii) $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$

*Pseudomonas denitrificans* と *Alcaligenes faecalis*

も  $\text{NO}$ -還元系は、細胞を音波で破壊し、 $20,000 \times g$  で遠心した上清を  $105,000 \times g$  で遠心して得た沈澱 (particulate-fraction) に存在する。どちら

の菌においても、 $\text{NO}$  を  $\text{N}_2\text{O}$  に還元する能力には soluble fraction はいらない<sup>(17,23)</sup>。*Pseudomonas denitrificans* の  $\text{NO}$ 還元酵素の可溶化は試みられたが成功していないので実態は分っていないが、阻害剤の効果から、 $\text{SH}$ -基と重金属が  $\text{NO}$ 還元系に関与していると推定された<sup>(17)</sup>。

*Alcaligenes faecalis* の  $\text{NO}$ 還元酵素の解析のための電子供与体として、ascorbate-PMS が効果的であることが分り<sup>(23)</sup>、それを使ってしらべてみるとやはり大部分が particulate fraction に存在するが、いくぶん soluble fraction にも出てきている (Table IV)。

Table IV ascorbate-PMS を電子供与体として使用した *Alcaligenes faecalis* の亜硝酸還元酵素及び  $\text{NO}$ 還元酵素の各分画における活性。

Preparation		$\text{NO}_2^- \rightarrow (\text{gas})$ $\mu\text{l gas}/\text{hr}/\text{mg protein}$	Apparent $\text{NO}$ -uptake $\mu\text{l NO}/\text{hr}/\text{mg protein}$
Fractionation by centrifugation	$105,000 \times g$ Sup.	1,500 ( $\text{NO}$ and a small amount of $\text{N}_2\text{O}$ )	5~19
	$105,000 \times g$ ppt.	39 ( $\text{N}_2\text{O}$ )	81
Fractionation of $105,000 \times g$ sup. by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation	0~30% sat.	314 ( $\text{NO}$ )	1.6
	30~60% sat.	1,030 ( $\text{NO}$ )	2.8
	60~100% sat.	6,150 ( $\text{NO}$ )	21~47

$105,000 \times g$  supernatant fraction には  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の活性はほとんどみられないが、これは実態はまだ明らかではないが、soluble fraction に、 $\text{NO}$ 還元酵素に対して阻害効果をもつ何らかの物質が存在するためマスキされている結果であることがわかってきた。すなわち、soluble fraction を硫酸で分画すると、0~30%飽和の fraction に、particulate fraction の  $\text{NO}$ 還元系に対して阻害的に作用する物質が多く存在していた。60~100%飽和の fraction には、 $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の触媒能が存在していた (Fig. 10)。明らかに、 $\text{NO}$ 還元酵素は可溶化され得るが、単に音波で

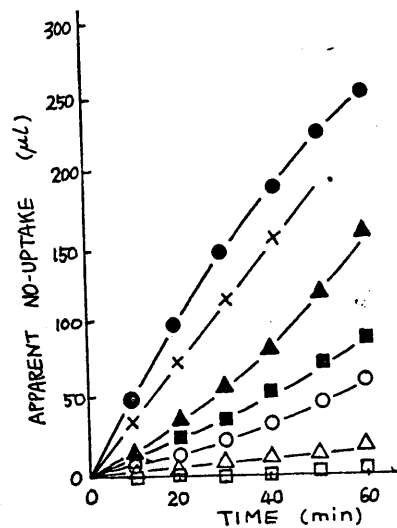


Fig. 10 いろいろな分画における NO還元活性と Fraction I または II による NO還元に対する阻害。  
*Alcaligenes faecalis* の可溶性分画を確定して 3 つに分画した。

—x— particulate fraction,  
—□— Fraction I (0~30% sat. of  $(\text{CNH}_4)_2\text{SO}_4$ )  
—△— " II (30~60% " "  
—○— " III (60~100% " "  
—■— particle + Fraction I  
—▲— " + " II  
—●— " + " III  
Electron donor is ascorbate-PMS. pH 7.0.

破壊しただけでは、可溶化されている酵素量は少なく、また可溶化されたものは失活が早いようなので、高度の精製はまだできていない。NO還元系に対する“endogenous inhibitor”が存在することは興味深い事実である。この実態を明らかにすることと共に、生体の中でも実際に何らかの反応調節をし得るかどうかにについてはこれからの問題である。

*Pseudomonas denitrificans* と *Alcaligenes faecalis* の NO還元系の性質のちがいは、前者より後者の方が KCN に対して、より感受性が高いことである。これは  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  に対する KCN による阻害度で直接知ることができるが、それより先に、KCN 存在下で亜硝酸から NO が放出されるか否かによってうかがい知ることができる。

亜硝酸還元酵素のちがいと同一ように、NO還元酵素の性質も、この両者の細菌で全くちがう可能性もあるので、その比較は興味深い問題になろう。

### ( iii ) $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

この  $\text{N}_2\text{O}$ -還元酵素の研究が最も困難なものである。前にも述べたように、*Pseudomonas denitrificans* を音波でぶつうに破壊し、 $3,600 \times g$  で遠心して得た上清 (crude extract) には、 $\text{N}_2\text{O}$ -還元活性は全くみられなくなってしまっており、亜硝酸からは、結局  $\text{N}_2\text{O}$  しか生産されない<sup>(15)</sup> (Fig. 11)。たとえば、グリセロール、シエクロール、アセトン、システイン、EDTA などを加えて音波破壊してもだめであった。 $\text{N}_2$  気中、あるいは  $\text{N}_2\text{O}$  気中で全く嫌気的な条件を与えて破壊しても、活性は保持されない。音波破壊法よりもっとおだやかなフレンチプレスによって破壊して得た extract も同じであり、またアセトン処理して乾燥させた菌体で

も  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の活性はいぜんとして存在するが、 $\text{N}_2\text{O}$  還元活性は全くななくなってしまう。このようなことから考えると  $\text{N}_2\text{O}$ -還元系は物理的にも化学的にもひじょうに不安定なものと考えられる。しかし一方、 $\text{N}_2\text{O}$ -還元酵素自身の不安定さではなく、電子供与体になる何かがだめになっているから乳酸から電子が伝達されないことによつて、extract においては活性がみられないということも考えられる。もしそうならば、 $\text{N}_2\text{O}$ -還元酵素に、人為的電子伝達体を使って直接電子が入れば活性が出現するはずである。そのために、いろいろな酸化還元色素を試したが、それらは  $\text{N}_2\text{O}$  還元に対して全く効果がないか、阻害的に働くかのどちらかだった (Table V) (未発表データ)。特に強い阻害をするものは、いずれも  $\text{N}_2\text{O}$  までの反応に対しては電子供与体となるものである。いくつかの色素による阻害の阻害曲線は一次阻害のようである。 $\text{N}_2\text{O}$ -還元酵素とこれらの色素との直接の結合による阻

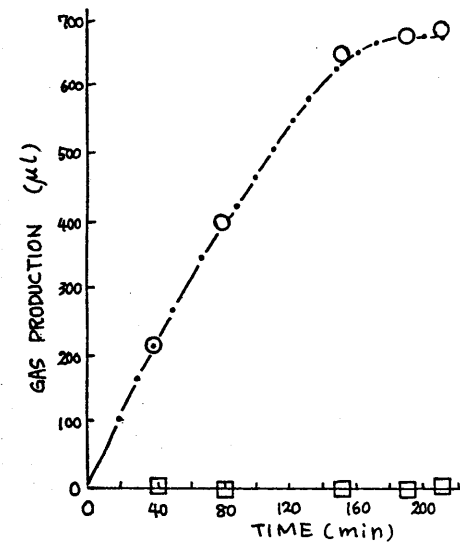


Fig. 11 *Pseudomonas denitrificans* を音波で破壊して調製した crude extract による亜硝酸からのガス生産。

- 全ガス生産量
- 生産された  $\text{N}_2\text{O}$
- ,  $\text{N}_2$

標品は、細胞を音波で破壊 (10 Kc, 20 分) し、3,600×g で 20 分遠心した上清。実験条件は、標品が crude extract である以外は、Fig. 1 と同じ。

害かもしれないが、いずれにしてもこの色素による阻害は  $\text{N}_2\text{O}$ -還元系の特殊性を示すものである。いまのところ、この反応段階の性質は生菌でしらべることがない。生菌による、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の反応に対する阻害剤の効果がしらべられたが、 $\text{KCN}$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{CO}$  などによる強い阻害

がみられること、monoiodoacetate,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  によつても強く阻害されることから、金属と SH-基が関与していることが推定される<sup>(15)</sup>。色素による阻害とちがって、 $\text{KCN}$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{CO}$  などによる阻害は一次的ではないようで、二次かそれ以上の阻害曲線である。特に  $\text{CO}$  による阻害が全く妙である。どうしても cell-free にならない場合は、いずれ kinetics など詳しくやってみるべ

Table V *Pseudomonas denitrificans* による  $N_2O$  の  $N_2$  への還元反応に対する、いろいろな色素の阻害効果、及び、色素の存在下で亜硝酸から生産されるガス。

阻害剤の代りに色素を与えている他、実験条件は Fig. 2 及び Table II の場合と同じ。 pH 7.0.

Substance	Molar conc.	Product from nitrite in the presence of the substance	% inhibition of the $N_2O$ reduction to $N_2$ by the substance
Hydroquinone	$10^{-2}$	$N_2O$ & $N_2$	0
Resorcinol	$10^{-2}$	$N_2O$ & $N_2$	0
Catechol	$10^{-2}$	$N_2O$ & $N_2$	0
o-Aminophenol	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	0
m-Aminophenol	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	0
p-Aminophenol	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	0
Methylene blue	$5 \times 10^{-3}$		100
	$10^{-3}$	$N_2O$	~100
	$10^{-4}$	$N_2O$ & $N_2$	85
	$5 \times 10^{-5}$		72
	$10^{-5}$		21
	$10^{-6}$		11
Phenazinemetosulfate	$10^{-3}$	NO 90 % or more	100
	$10^{-4}$	NO & $N_2O$	100
	$10^{-5}$		73
Thionine	$10^{-3}$	NO & $N_2O$	100
Neutral red	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	71
o-Phenylenediamine	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	37
m-Phenylenediamine	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	0
p-Phenylenediamine	$2.5 \times 10^{-2}$	$N_2$ (see ref. 18).	100
	$10^{-3}$		59
Dimethyl-p-phenylenediamine	$2.5 \times 10^{-2}$	$N_2$ (see ref. 18)	100

Table V (continue)

Substance	Molar conc.	Product from nitrite in the presence of the substance	% inhibition of the $N_2O$ reduction to $N_2$ by the substance
Janus green	$10^{-3}$ $10^{-4}$	$N_2O$ & $N_2$	87 11
2,6-dichlorophenol-indophenol	$10^{-3}$ $10^{-4}$	$N_2O$ & NO	83 0
9-Aminoacridine	$10^{-3}$	$N_2O$ & $N_2$	32
Toluylene blue	$10^{-3}$ $10^{-4}$	NO & $N_2O$	100 53
Fenosaflanine	$10^{-3}$ $10^{-4}$	$N_2O$ & $N_2$	96 0
Brilliant cresyl blue	$10^{-3}$ $10^{-4}$	$N_2O$ & NO	100 93
Toluidine blue	$10^{-3}$ $10^{-4}$	$N_2O$ & NO	100 68

きと思われる。生菌ではない標品における。

$N_2O$ -還元系の解析の突破口になるかもしれない。

いのは、凍結乾燥した細胞において活性は保

持されていることを利用することである。ま

た sodium deoxycholate を作用させると、亜硝酸

還元系や NO 還元系はだめになってしまうのに、

$N_2O$ -還元系は全くだめになってしまうわけでは

ない。このことも利用できるかもしれない。

ない。



*Alcaligenes faecalis* や *Pseudomonas denitrificans* - それに *Pseudomonas stutzeri* における  $N_2O$  から  $N_2$  への反応系の性質は、お互いにひじょうによく似ているようである。阻害剤のきき方も似ているし、細胞を破壊すると全く活性がみられなくなってしまうのである<sup>(23)</sup>。*Alcaligenes faecalis* の  $NO$  還元酵素は soluble fraction に出てきているのに、何か "endogenous inhibitor" が存在するために、soluble fraction における活性はマスキされていることは前にのべたが、 $N_2O$ -還元系に対しても同じように、何か強力な "endogenous inhibitor" が存在していることによって活性がみられないことも考えられるが、今のところそのような事に肯定的な何物もない。

#### V $NH_2OH$ の効果

*Pseudomonas denitrificans* は、 $NH_2OH$  と亜硝酸から  $N_2O$  を生産し、その量は与えた亜硝酸の  $N$  量の2倍近くであったので、 $NH_2OH$  と亜硝酸とが

反応して  $N_2O$  を生産するということが報告され、同時に、乳酸を共に与えた場合は、放出されるガスは  $N_2$  になるということだった<sup>(9)</sup>。ガス分析法は、ガスの水に対する溶解度に基づくものであったので、改めて検圧法とガスフロマトグラフィーの併用により分析を行ったところ<sup>(18)</sup>、たしかに  $NH_2OH$  と亜硝酸から  $N_2O$  が生産され、与えた亜硝酸の  $N$  量の1.9倍になるが、乳酸を共に与えた場合は、 $N_2$  はほとんど生産されず、 $NO$  と  $N_2O$  が生産された (Fig. 12-a, b, c)。 $NO$  の水に対する溶解度は  $N_2$  のそれとちがっているとしても  $N_2O$  のそれとの違いほどいぢがわるしいものではないので、事実上溶解度に基づく測定方法では  $NO$  と  $N_2$  とは区別できないであろう。乳酸- $NH_2OH$ -亜硝酸の反応系で、 $NH_2OH$  の濃度が  $2 \times 10^{-2} M$  の場合、生産されているガスの  $N$  量は亜硝酸の  $N$  量の約1.7倍で、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $1 \times 10^{-3} M$  ではそれぞれ1.3倍から1.1倍になった。つまり、 $NH_2OH$  の濃度が低くなると、それは大部分が消費されなくなってしまうということ

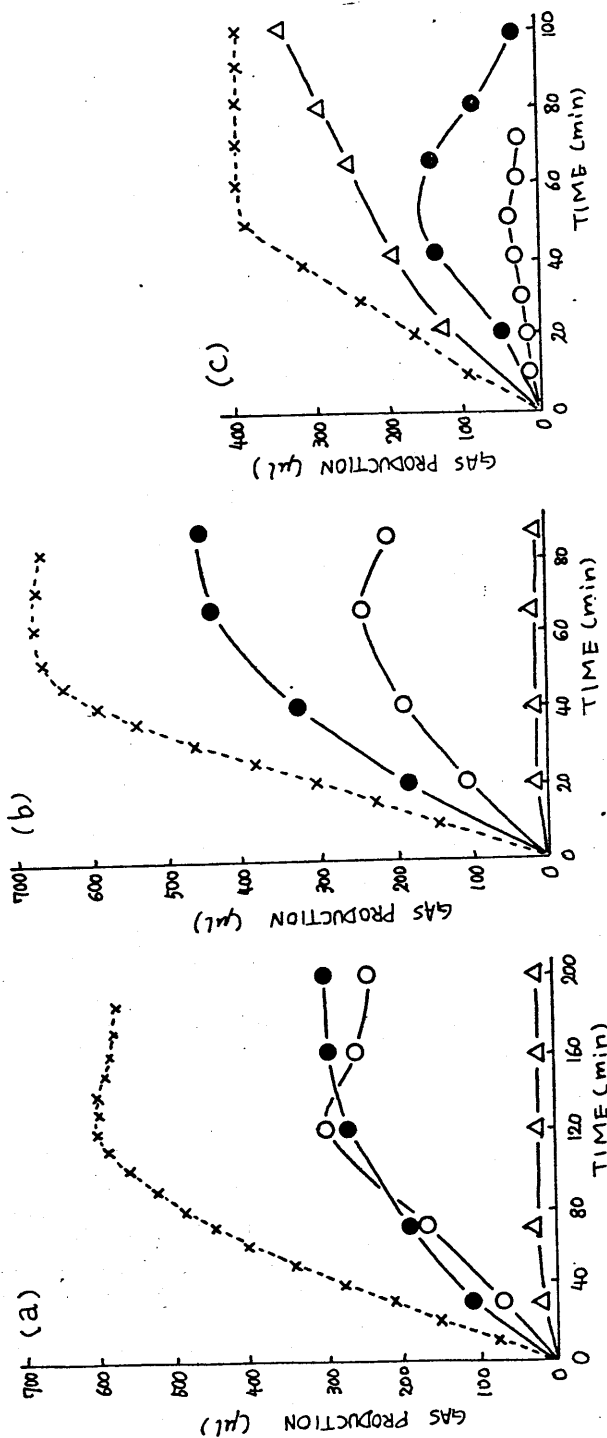


Fig. 12 *Pseudomonas denitrificans* による、lactate -  $\text{NH}_2\text{OH}$  - 亜硝酸 反応系におけるガス生産。

---x--- ワールブルグ検圧法により測定した全ガス生産量。

—○—  $\text{NO}$  , —●—  $\text{N}_2\text{O}$  , —△—  $\text{N}_2$  ; ガスワロマトグラフによる定量。

Main cup : cell suspension (a: 3.8, b: 5.0, c: 7.4 mg dry wt cells / flask),  $\frac{1}{2}$  M phosphate buffer, pH 7.0, 0.6 ml,  $\frac{1}{2}$  M Na-lactate 0.6 ml, Total volume: 6.0 ml,

Side arm :  $\frac{1}{10}$  M  $\text{NaNO}_2$  and  $\text{NH}_2\text{OH}$  0.3 ml, Gas phase:  $\text{He}$ .

Center well : 20% KOH 0.2 ml, Gas phase:  $\text{He}$ .

はしに与えた  $\text{NH}_2\text{OH}$  の final concentration: (a)  $5 \times 10^{-3}$  M, (b)  $2.5 \times 10^{-3}$  M, (c)  $1 \times 10^{-3}$  M.

ガスワロマトグラフ; Column: Silica gel 2m, Carrier gas:  $\text{He}$ , Flow rate: 30 ml/min, Column temp.:  $30^\circ\text{C}$ , Bridge current: 180 mA.

20×40

を意味する。与え

た  $\text{NH}_2\text{OH}$  の濃度が

$10^{-3}$  M の場合のガス

放出パターンは、

$\text{NH}_2\text{OH}$  を与えてない

場合とよく似てい

る。放出された  $\text{NO}$

は反応の遅い時期に、わずかずつではあるが

消費され、代りに  $\text{N}_2\text{O}$  が増加していることが

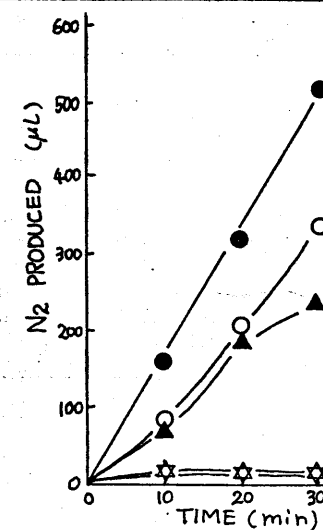
みられる。与えた  $\text{NH}_2\text{OH}$  の濃度が  $2 \times 10^{-2}$  M,  $5 \times 10^{-3}$  M

のいずれの場合も、放出された  $\text{N}_2\text{O}$  はもはや

$\text{N}_2$  にまで還元されないことは、反応液中に消

費されずに残っている  $\text{NH}_2\text{OH}$  による、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$

Fig. 13  $\text{NH}_2\text{OH}$  ( $5 \times 10^{-3}$  M) 存在下で、  
*Pseudomonas denitrificans* による  
 $\text{NO}$  と  $\text{N}_2\text{O}$  からの  $\text{N}_2$  生産。



—●—  $\text{N}_2$  from  $\text{N}_2\text{O}$ , ( $-\text{NH}_2\text{OH}$ )  
—▲—  $\text{N}_2$  from  $\text{NO}$ , ( $-\text{NH}_2\text{OH}$ )  
—○—  $\text{N}_2$  from both  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{NO}$ , ( $-\text{NH}_2\text{OH}$ )  
—△—  $\text{N}_2$  from  $\text{NO}$ , ( $+\text{NH}_2\text{OH}$ )  
—▽—  $\text{N}_2$  from both  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{NO}$ , ( $+\text{NH}_2\text{OH}$ )

Hydrogen donor:  $\frac{1}{10}$  M Na-lactate,  
pH 7.0 (phosphate buffer).

ガスワロマトグラフ; Column: Molecular Sieve  
13X 2m, Carrier gas:  $\text{He}$ , Flow rate: 60  
ml/min, Column temp.:  $30^\circ\text{C}$ ,  
Bridge current: 180 mA

LIFE C162



の反応に対する阻害の結果と考えられるが、それだけでは説明がつかない。即ち、残っているであろう濃度より濃い  $\text{NH}_2\text{OH}$  によっても、 $\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  の阻害は完全ではない (Table VI)。阻害の様式も非拮抗的のようであるし、pH が変化しても阻害度はほとんど変わらない。結局、その阻害機構は不明だけれど、NO と  $\text{NH}_2\text{OH}$  が共に存在すると  $\text{N}_2$  は全く生産されないという事実が明らかになった。Fig. 13 に示したように、NO による  $\text{N}_2$  生成の阻害もいくらかみられるし、 $\text{NH}_2\text{OH}$  が NO と共に存在する時は、 $\text{N}_2$  は全く生産されない。この結果から、生産された NO と残っている  $\text{NH}_2\text{OH}$  の共同で、 $\text{N}_2$  の生産を阻害している結果が、Fig. 12-a, b のようなガス放出のパターンを示すものと理解された。

精製された「脱窒酵素」 (= 亜硝酸還元酵素) は、 $\text{NH}_2\text{OH} + \text{HNO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$  の反応を触媒することは岩崎ら<sup>(11-13)</sup> によって報告されたが、この反応は「脱窒酵素」のもつ性質の一面で、生菌では乳酸が共に存在すると正常な

脱窒反応、即ち、 $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の反応が起ると考えられる<sup>(18)</sup>。NO が放出されるのは、 $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の反応段階が、 $\text{NH}_2\text{OH}$  によって阻害されるからであり、与えた  $\text{NH}_2\text{OH}$  の濃度によってガス放出のパターンが変化するのは、 $\text{NH}_2\text{OH} + \text{HNO}_2$  の反応がより起りやすいか、乳酸を電子供与体とする正常な脱

窒反応の方が起りやすいかの兼ねあいと考えられる。これらの結果は、 $\text{NH}_2\text{OH}$  が、少なくとも通常の亜硝酸から  $\text{N}_2$  に至る反応には無関係であることを示していると思われるが、前にも述べたように、亜硝酸還元酵素の性質を区別する上には興味深い重要な反応と思われる。今まで脱窒菌の亜硝酸還元酵素が cytochrome cd-type であるとわかっているのは、*Pseudomonas*

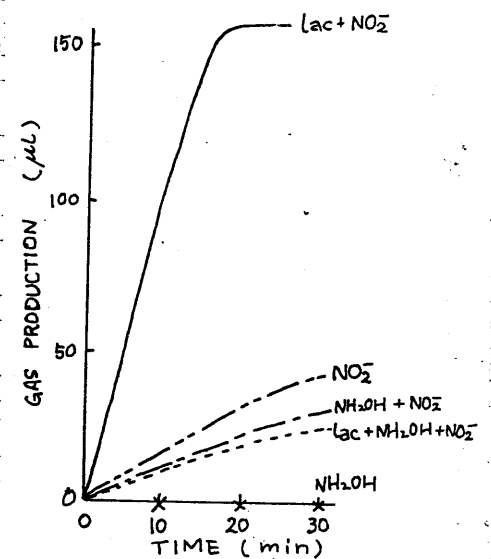


Fig. 14 *Alcaligenes faecalis* の亜硝酸還元に対する  $\text{NH}_2\text{OH}$  の効果。  
Main cup: cell suspension 0.5 ml,  $\frac{1}{2}$  M phosphate buffer, pH 7.0, 0.3 ml,  $\frac{1}{2}$  M Na-lactate 0.3 ml,  
Side arm:  $\frac{1}{20}$  M  $\text{NaNO}_2$  0.3 ml,  $\frac{1}{20}$  M  $\text{NH}_2\text{OH}$  0.3 ml,  
Total volume: 3.0 ml,  
Center well: 20% KOH 0.2 ml  
Gas phase: He.

*aeruginosa*<sup>(30)</sup>, *Micrococcus denitrificans*<sup>(31)</sup>, *Alcaligenes faecalis*<sup>(24)</sup>, *Pseudomonas stutzeri*<sup>(28, 29)</sup> で、これらの菌はいずれも  $\text{NH}_2\text{OH}$  を消費せず、むしろ亜硝酸還元に対し  $\text{NH}_2\text{OH}$  は阻害的に作用する。*Alcaligenes faecalis* による亜硝酸からのガス生産反応に対する  $\text{NH}_2\text{OH}$  の効果<sup>(23)</sup> は Fig. 14 に示したが、明らかに *Pseudomonas denitrificans* の場合<sup>(18)</sup> とちがって、 $\text{NH}_2\text{OH}$  は阻害剤として作用している。

今のところ亜硝酸還元酵素が Cu-protein であるのは、*Pseudomonas denitrificans* だけだが、最近になって、*Corynebacterium nephridii* は、

$\text{NH}_2\text{OH} + \text{HNO}_2 + \text{乳酸}$  の反応系で  $\text{NH}_2\text{OH}$  が消費されることと、 $\text{NO}$  が生産されることが報告され<sup>(3)</sup>、これは  $\text{NH}_2\text{OH}$  による  $\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$  の反応に対する阻害による結果であるということである。これらの結果をみると、 $\text{NH}_2\text{OH}$  に対する感受性のちがいこそあれ、*Pseudomonas denitrificans* の場合とほぼよく似ているので、この細菌の亜硝酸還元酵素は Cu-protein-type ではなかろうかと予想される。この *Corynebacterium nephridii*

は、むしろ *Achromobacter nephridii* と呼ぶべきだと報告されている<sup>(32)</sup>。一方、われわれが使ってきた *Pseudomonas denitrificans* は、*Pseudomonas* ではなくて *Alcaligenes* か *Achromobacter* であろうということだが、亜硝酸還元酵素のタイプで分ければ、*Achromobacter* あるいは *Corynebacterium* であるかもしれない。比較生化学的観点からも、さらに広範な研究が期待される。

## VI いろいろな条件下で生育した菌における脱窒反応<sup>(19)</sup>と電子伝達系成分<sup>(19, 24)</sup>

細胞を破壊すると  $\text{N}_2\text{O}$  から  $\text{N}_2$  の反応は全くなくなってしまい、cell-free系においてこの反応系をしらべることができないことは前にのべた。 $\text{N}_2\text{O}$ -還元活性を有する細胞から得た抽出液に活性がなくなっているとしても、それに必要な成分が存在することは明らかであろう。知られ得る成分のうちどのようなものが  $\text{N}_2\text{O}$ -還元系に必要で、どのようなものが必要で

ないと考えられるかということを知るのが、この研究の目的の一つだった。同時に、 $N_2O$ 還元系が誘導される条件についていくばくかの資料が得られるし、それが脱窒反応に対する酸素の効果の研究、すなわち嫌氣的呼吸と好氣的呼吸の研究に役立つであろうという考えもあった。

脱窒反応系が誘導酵素系である以上、“inducer”が存在しなければ、その支配下にある反応系は誘導されないにちがいない。 $N_2O$ だけを与えて嫌氣的に生育した菌は、 $N_2O \rightarrow N_2$ の反応系だけが誘導されることが期待される。このような細胞がもつ成分と、脱窒系を完全にもっている硝酸で生育した細胞がもつ成分、脱窒系を全くもたないはずの硝酸なしで好氣的に生育した細胞の成分を比較定量することにより、少くとも必要だから合成されているという仮定にたてば、 $N_2O$ 還元系に必要と考えられる成分のリストアップが出来るだろうと考えられた。

# *Pseudomonas denitrificans*

は、Fig. 16 に示したように、 $N_2O$ で生育するためには、かなり短い lag-period を要するにすぎない。pre-culture は硝酸を加えない培地で振とう培養させ、対数期にある細胞を植えておいて、後で示すように脱窒系は誘導されていく。増殖の開始に先だつ lag-period が短いことは、 $N_2O$ 還元系がひじ

ように誘導されやすい系であることを示している。生長速度も好氣的に生育したものには及ばないが、硝酸で嫌氣的に生育したものと

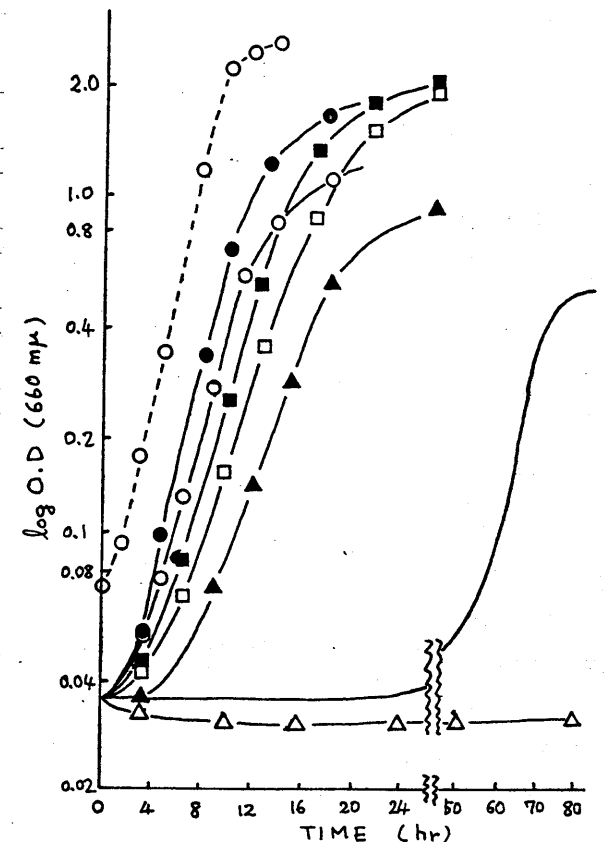


Fig. 16 いろいろな条件での *Pseudomonas denitrificans* の増殖。

preculture は、 $KNO_3$  を加えない培地で 16 時間 shaking culture.

- $N_2O$ -anaerobic (+ $KNO_3$ )
- " (- $KNO_3$ )
- Low-aerobic (+ $KNO_3$ )
- " (- $KNO_3$ )
- High-aerobic (- $KNO_3$ )
- ▲— Anaerobic (+ $KNO_3$ )
- △— " (- $KNO_3$ )
- —  $NO_2^-$ -anaerobic (0.2%)

ほぼ同じである。硝酸還元とカップルしてリン酸化が起ると報告されているので、この<sup>(33)</sup>  
 $N_2O$ -還元系にもカップルしてリン酸化が起っているに相違ない。少なくとも、硝酸で生育する場合と同じ位の能率でエネルギー代謝系が動いていることが考えられる。亜硝酸ではじょうに生育しにくい。長い lag-period が必要であるし、成長速度も遅い。誘導されにくい系であることもあろうが、亜硝酸が酵素の誘導と生長に毒作用をもつ結果と思われる。

*Alcaligenes faecalis* では、同じように  $N_2O$  での生育は、短い lag-period があつてはじまる。硝酸で生育するよりも短い。しかし、亜硝酸ではやはり長い lag period の後に生育し、亜硝酸を与えて好氣的に培養すると生育しない<sup>(24)</sup>。

いろいろな条件で生育した *Pseudomonas denitrificans* における、亜硝酸から  $N_2$  に至る各反応段階の活性は Table VII に示した。 $N_2O$  で嫌氣的に生育した菌には、高い  $N_2O$ -還元活性があり、亜硝酸からのガス生産活性と、 $NO$ -還元活性は低い

Table VII いっさい条件で生育した *Pseudomonas denitrificans* の脱窒活性。

Addition of $KNO_3$	Growth condition	Activities	
		$NO_2^- \rightarrow$ (gas) $\mu\text{L gas/hr/mg dry wt. cells}$	$N_2O \rightarrow N_2$ $\mu\text{L } N_2/\text{hr/mg dry wt. cells}$
-	Low-aerobic (end) <sup>2)</sup>	13.9 (NO 90 % or more)	172
	Low-aerobic (log) <sup>2)</sup>	0.7	0
	High-aerobic (end)	0	0
	$N_2O$ -anaerobic (end)	14.6 (NO 90 % or more)	217
+	$N_2O$ -anaerobic (log)	13.8 (NO 90 % or more)	206
	Low-aerobic (end)	43.0	211
	anaerobic (end)	55.0 (via $N_2O$ to $N_2$ )	180
	$N_2O$ -anaerobic (end)	57.0	195

1)  $NO$  uptake measured by manometry is an apparent one, that is, the reaction refers to the change  $2NO \rightarrow N_2O$  and/or  $N_2$ .

2) "End" and "log" mean cells of the stationary phase and those of the log phase of growth, respectively.

けれども存在する。high-aerobic condition で生育した菌には脱窒活性はない。硝酸が存在すれば、いずれの培養条件を与えても、高い脱窒活性がある。不思議なことに、硝酸を加えない培地で、low-aerobic condition で生育した菌は、対数期においては活性はないが、定常期に入った細胞には、 $N_2O$  で嫌氣的に生育した菌と同じような活性を有する。亜硝酸、 $NO$ -還元活性が少しあることについては、使用した培地に、ペプトンと肉エキスに由来する  $10^{-6}M$  程度の硝酸が存在することと、振とう培養法では酸素供給量が不十分で、それによって生じた部分的嫌気条件によってこのくらいは誘導されるだろうと思われるが、そのような条件があっても、硝酸で生育した菌と同じ位完全に、 $N_2O$ -還元系が誘導されている事実は、この系がひじょうに誘導しやすい系であることを示している。 $N_2O$ -還元酵素系は  $N_2O$  によって誘導されるばかりではなく、 $10^{-6}M$  という低濃度の硝酸の存在も誘導に何らかの役割を果し

ているかもしれないが、詳しい各酵素系の誘導のメカニズムについては、完全に  $NO_3$ ,  $NO_2$ -free の培地を使って詳細に研究されねばならない。酸素が少しぐらいあっても、 $N_2O$ -還元系だけはほとんど完全に誘導され得るという事実は、field における無機窒素代謝の研究を、より精密に進めてゆくための一つの資料になるのではなかろうか。

$N_2O$  で生育した菌は、硝酸で生育した菌と同じく、particulate-bound の cytochrome b, cytochrome c-552, soluble fraction に、cytochrome c-553<sup>(22)</sup>, cryptocytochrome c<sup>(12,21)</sup> を含むが、量的には cytochrome c-552 と cytochrome c-553 においてかなりちがいはある (Fig. 17-a, b, Table VIII)。「脱窒酵素」(亜硝酸還元酵素<sup>(13)</sup>) と blue protein<sup>(12)</sup> の含量は、Sephadex G-200 column で分離した上で、Cu の含量として原子吸光分光分析法により測定したが、 $N_2O$  で生育した菌における前者の含量は少なかった。cytochrome b, cryptocytochrome c, blue protein の含量は、high-

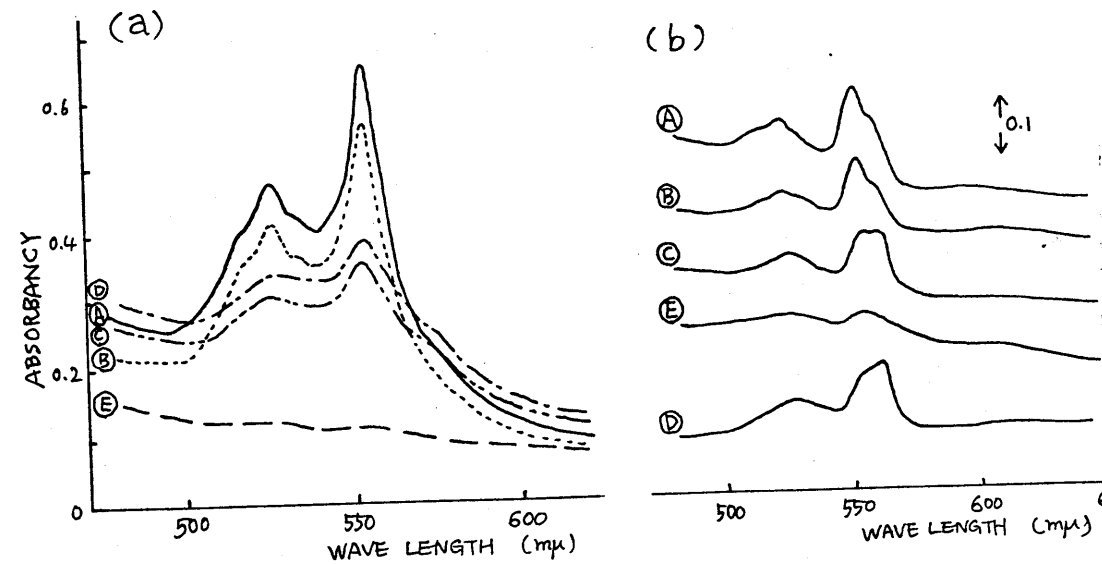


Fig. 17 いろいろな条件で生育した *Pseudomonas denitrificans* から調製した soluble fraction の還元型吸収スペクトル (a) と、particulate fraction の酸化型-還元型差スペクトル (b)。

Soluble fraction; ① —:  $N_2O$ -Anaerobic (8.1 mg protein/ml), ② ———: Low-aerobic (6.7 mg protein/ml), ③ ———:  $NO_3^-$ -anaerobic (11.8 mg protein/ml), ④ ———:  $NO_2^-$ -anaerobic (10.4 mg protein/ml), ⑤ ———: High-aerobic (8.3 mg protein/ml).  
Particulate fraction; ①  $N_2O$ -anaerobic (2.5 mg protein/ml), ② low-aerobic (2.3 mg protein/ml), ③  $NO_3^-$ -anaerobic (2.5 mg protein/ml), ④  $NO_2^-$ -anaerobic (2.4 mg protein/ml), ⑤ high-aerobic (2.6 mg protein/ml).

aerobic condition で生育した菌をのぞいて、いずれもたいした差はない。これらの結果から、「脱窒酵素」は明らかに  $N_2O$ -還元系に関係がうすいと結論できるが、他の物質については、必要だから合成されているという仮定の上には、cytochrome c-552, cytochrome b, cytochrome c, cytochrome c-553, blue protein が、

Table VIII いろいろな条件で生育した *Pseudomonas denitrificans* におけるいくつかの電子伝達系成分の相対的含量<sup>(19)</sup>。

	$N_2O$ -anaerobic	$NO_3^-$ -anaerobic	High-aerobic	Low-aerobic
Denitrifying enzyme	0.3 ~ 0.4	1	0	0.2 ~ 0.4
Blue protein	0.9 ~ 1.0	1	< 0.1	0.7 ~ 1.1
Cryptocytchrome c	1.0 ~ 1.1	1	0.2	0.8 ~ 0.9
Cytochrome c-553	2.7 ~ 2.8	1	0.2 ~ 0.3	2.5 ~ 2.8
Cytochrome c-552	1.8 ~ 1.9	1	0.2	1.6 ~ 1.7
Cytochrome b	1.0 ~ 1.3	1	0.2	1.0 ~ 1.3

$N_2O$ -還元系に何らかの役割を果たしている可能性は考えられる。cytochrome c-553 と cytochrome c は CO-結合性の cytochrome であること、生菌における亜硝酸還元、NO還元、 $N_2O$ -還元反応のうち、 $N_2O$ -還元反応が最も CO に対して sensitive であることと考えあわせ、何か深い関係をもつのではないかとと思われるのである<sup>(19)</sup>。他に、particulate-bound の Cu と Fe の含量もしらべられて、non-heme Fe-protein の存在が示唆された<sup>(19)</sup>が、 $N_2O$ -還元系との関連を論じられるほどに至っていない。particulate-



fraction に存在する Cu の、代謝との関係について、これからの問題となろう。

*Alcaligenes faecalis* においても、いろいろな条件で生育した菌について、そのチトクローム含量がしらべられた<sup>(24)</sup>。*Pseudomonas denitrificans* と同じように、生育条件によって各々のチトクロームの含量が変化してくる。Cytochrome cd と cytochrome c-557(551) の2種の変化が特にいちぢるしかった。N<sub>2</sub>O で嫌氣的に生育した、*Alcaligenes faecalis* は、亜硝酸還元酵素としての cytochrome cd がわずかしかなく、他と比べて、cytochrome c-557(551) がかなり増加していた。cytochrome c-557(551) は、*Pseudomonas denitrificans* の cytochrome c-553 と似た性質をもっており、CO-結合性なので、興味深いことであつた。

*Pseudomonas stutzeri* の場合<sup>(27,28)</sup> とちがつて、*Pseudomonas denitrificans* も *Alcaligenes faecalis* も、亜硝酸で生育した菌におけるチトクローム含量が、硝酸で生育した菌のそれよりも高いといふことはなく、ほとんど同じであつた。

このように種類によってそれぞれ特徴があるが、生育条件によって、チトクローム含量がかなりいちぢるしく変ることとは同じようにみられ、広範に比較研究をすることはたいせつなことと思われろ。

## VII おすび

研究が進むにつれていろいろなことが明らかになってきたが、それに併って、また新たにいくつかの問題が現われてきた。酵素化学的には、Cu-protein type と cytochrome cd-type の亜硝酸還元酵素が、なぜ同じような機能をもちうるか、NO-還元酵素の本体はどのようなものか、N<sub>2</sub>O-還元酵素活性は、どのようにしたら cell-free 系で研究できるかが興味の中にある。N<sub>2</sub>O-還元系については、cell-free にならないうとしても、さらに生菌でその性質を知るべきである。またこれら還元酵素系の比較生化学的研究もさらに進めることは、興味深い問

題となろう。呼吸鎖との関連において、脱窒  
 系に酸素がどのような効果をもった研究は、  
 今までに明らかになつてきたガス代謝の研究  
 成果を使って、よりきめこまかく調べられる  
 ことになった。この研究は、生態系での無機  
 窒素代謝の研究にとつても、有効なデータを  
 提供することになるであろう。これらに加え  
 て、脱窒反応の各段階の反応系の誘導と調節  
 のメカニズムに興味深いいくつかの問題が残  
 されている。誘導因子として最低限どれだけ  
 が必要であるかという基本的問題と、*Alcaligenes*  
*faecalis* の NO 還元系に対する "endogenous inhibitor"  
 の存在のように、実際に反応を調節するかも  
 しれない因子についての問題である。

研究テーマと機会をいただき、始終多くの  
 助言とはげましてくださった、森教授に心か  
 ら感謝いたします。

実験技術と研究方法の向上は、岩崎秀一博  
 士に負うところが多かった。岡本尚博士には、  
 科学的考え方など少なからず学んだ。両博士  
 に対する感謝はつきません。



## 分 献

- (1) V. Gayon and G. Dupetit, Soc. sci. phys. naturelles Bordeaux, Series 3, 2, 201 (1886)
- (2) 1962 年以前の研究は、次のような総説を参照。  
C. C. Delwiche, Denitrification in "Symposium on inorganic nitrogen metabolism", ed. by W. D. McElroy and B. H. Glass, John Hopkins Press, Baltimore, p. 233 (1956)  
C. A. Fewson and D. J. D. Nicholas, Nature, 190, 2 (1961)  
A. Nason, Bact. Rev., 26, 16 (1962)
- (3) E. D. Renner and G. Becker, J. Bacteriol., 101, 821 (1970)
- (4) M. B. Allen and C. B. van Niel, J. Bacteriol., 64, 397 (1952)
- (5) J. E. Sacks and H. A. Barker, J. Bacteriol., 64, 247 (1952)
- (6) F. Pichinoty and L. D'Ornano, Ann. Inst. Pasteur, 101, 418 (1961)
- (7) H. Iwasaki and T. Mori, J. Biochem., 42, 375 (1955)
- (8) H. Iwasaki, R. Matsubayashi and T. Mori, J. Biochem., 43, 295 (1956)
- (9) H. Iwasaki and T. Mori, J. Biochem., 45, 133 (1958)
- (10) H. Iwasaki, J. Biochem., 47, 174 (1960)
- (11) H. Suzuki and T. Mori, J. Biochem., 52, 190 (1962)
- (12) H. Suzuki and H. Iwasaki, J. Biochem., 52, 193 (1962)
- (13) H. Iwasaki, S. Shidara, H. Suzuki and T. Mori, J. Biochem., 53, 299 (1963)
- (14) M. Miyata and T. Mori, J. Biochem., 64, 849 (1968)
- (15) T. Matsubara and T. Mori, J. Biochem., 64, 863 (1968)
- (16) M. Miyata and T. Mori, J. Biochem., 66, 463 (1969)
- (17) M. Miyata, T. Matsubara and T. Mori, J. Biochem., 66, 759 (1969)
- (18) T. Matsubara, J. Biochem., 57, 229 (1970)
- (19) T. Matsubara, J. Biochem., (1971) in press
- (20) 松原輝男, 宮田町子, 寺井久慈, 森健志, 土と微生物 11, 45 (1969)

- (21) H. Iwasaki and S. Shidara, Plant & Cell Physiol., 10, 291 (1969)
- (22) H. Iwasaki and S. Shidara, J. Biochem., 66, 775 (1969)
- (23) T. Matsubara and H. Iwasaki, J. Biochem., (1971) in press
- (24) H. Iwasaki and T. Matsubara, J. Biochem., (1971) in press
- (25) H. Suzuki and T. Mori, Bot. Mag. Tokyo, 79, 28 (1966)
- (26) R. S. Bread, E. G. D. Murray and N. R. Smith, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology," 7th ed., p. 297 (1957)
- (27) T. Kodama, K. Shinada and T. Mori, Plant & Cell Physiol., 10, 855 (1969)
- (28) T. Kodama, Plant & Cell Physiol., 11, 231 (1970)
- (29) 設楽, 岩崎, 板垣, 森, *Ps. stutzeri* の脱窒反応について, オ 29 回 日本植物学会大会記録, p. 65 (1964)
- (30) T. Yamanaka, Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ., 11, 77 (1963)
- (31) N. Newton, Biochim. Biophys. Acta, 185, 316 (1969)
- (32) L. T. Hart, A. D. Larson and C. S. McCleskey, J. Bacteriol., 89, 1104 (1965)
- (33) T. Ohnishi, J. Biochem., 53, 71 (1963)