

家蚕硝酸還元酵素の水素供与体に就て

大村, 浩久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21315>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 14 (3), pp.415-421, 1954-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

家蚕硝酸還元酵素の水素供与体に就て

大 村 浩 久

On the hydrogen-donators of the nitrate
reductase of silk-worm

Hirohisa Omura

緒 言

家蚕硝酸還元酵素は組織並びに消化管にかなり緊密に結合して存在し、単に石英砂と共に磨砕するだけでは抽出されず、現段階に於ては細胞外に分離する事には成功していないので、通常背部を切開して消化管を破らないように内容物を含んだまま摘出除去した組織を十分洗滌し水又は磷酸緩衝液と磨砕懸濁し酵素液として用いてきた。

従来基質其の他の諸因子の外、多数の関連する反応系をも包含している生細胞を離れて抽出純化された酵素製品は、触媒作用を持つ複雑な有機化合物として、化学の分野に於ては取り扱はれてきたが、その試験管内で示す反応は必ずしも生体内に於ける酵素本来の行動を全面的に反映しているとは云い難く、生物学的立場からは過度には精製せず基質並びに諸因子及び関連する諸酵素系をも含んだ homogenate 又は切片を使用する事も無意味では無く場合によつては寧ろ好ましい様にも考える。

併し無用の不純物の混合を避ける事は当然であつて、蚕児に於てはその大部分を占める消化管に充満している食下された桑葉や強アルカリ性の黄褐色の粘濁な消化液には硝酸還元酵素は検出されない上、反応液を着色して生成 NO_2 の比色測定を妨害し酵素力の判定を困難にする外、反応液の pH をアルカリ側に移動させる事、当研究室に於てバイラス誘起作用を持つ事が見出された NH_2OH や KNO_2 のような含窒素無機塩を添食した蚕児の全蚕体を酵素剤とした場合反応は著しく弱く酵素は不活性化されたかの結果を示すが、消化系統を除き更に附着血液をも洗滌除去した組織のみに就ては却て活性化され、添食された塩類自身或は此の反応生成物若くは之と血液又は消化液成分との結合物が酵素反応を阻害するらしい事等種々の影響を観察した。之等の混乱を避けるためには或る程度精製する事は必要であつて、家蚕酵素では場合によつては組織抽出残渣の再懸濁液を使用した。此の場合抽出処理による作用力の低下は免れ得なかつた。

実 験

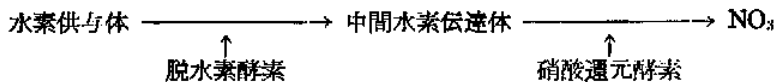
家蚕硝酸還元酵素に対する抽出処理による作用力低下の一例を第1表に示す。消化管を除いた支 108 種、5 齡蚕組織 10 g を十分に水洗した後少量の石英砂を加え pH 7.4 の M/10 磷酸緩衝液と共によく磨砕、100 cc 懸濁液とし之を原酵素液とした。本液 90 cc を 2500 r. p. m. に 10 分間遠心分離し残渣を再び同一緩衝液に磨砕懸濁 90 cc に復した(残

第1表. 家蚕組織抽出効果.
 10^{-2} M NO_3 , pH 7.4, 35° , 20 h.

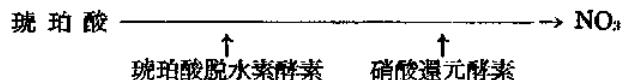
酵素剤	酵素量 g		原酵素液	残渣酵素液-1	残渣酵素液-2
新鮮組織	0.5	生成 NO_2 , $\times 10^{-2}$ M	0.578	0.161	0.051
		比	100	27.9	8.8
アセトン粉末	0.05	生成 NO_2 , $\times 10^{-2}$ M	0.56	0.54	0.28
		比	100	96	50

渣酵素液-1). 以下同様に抽出処理を行う(残渣酵素液-2, ……). 従つて之等の酵素液各 5 cc は何れも家蚕新鮮組織 0.5 g 又は之に相当する量を含有する. 同じ様にアセトン乾燥粉末に就ても 5 cc 当り 0.05 g 又は相当量を含む様に酵素液を調製し, 之等の各酵素液 5 cc と 2×10^{-2} M NaNO_2 溶液 5 cc とを混合しトルオール層の被覆下に 35° , 24 時間反応させた後常法に従つて生成 NO_2 を測定したが, 生体では 1 回抽出で約 1/4, 2 回で 1/12 に作用力は激減し又アセトン粉末でも 2 回で約 1/2 と程度は小さいが酵素力の減少を惹起した. 尙此の場合原酵素液を用いた反応液は潤濁しているが残渣では殆ど清澄で酵素組織は試験管底に沈積し特別に醋酸鉛若くは醋酸による除蛋白を必要としなかつた.

元来硝酸還元酵素といつても硝酸塩のみを特異的に還元する酵素は見出されて居らず, Bernheim 及び Dixon 氏 (1928) は硝酸塩を直接の水素受容体としてアルデヒドの酸化を行い且つシアンによる阻害性を示さないアルデヒド酸化酵素と, 青酸感受性の然も既知の脱水素酵素とは異なる nitrate reducing system と呼ばれるものとの 2 種存在すると主張し, 照井氏 (1936) は同氏の細胞外抽出酵素はシアン感受性(重金属接触性)及び硝酸還元性の両性質によつて特徴づけられる dehydrase であつて, 硝酸塩は脱水素酵素の水素受容体であると考えたが, 山県氏 (1938) は脱水素酵素によつて基質から或る中間体に水素が転移され之に硝酸還元酵素が作用して硝酸塩に水素を伝達するとし, その反応機構に関し次式



を提案し, 江上, 佐藤両氏 (1948) は之を確認すると共に少くとも dl-アラニンが水素供与体の時は $\text{D} \cdot \text{ニユークレオチツド}$ が中間体となり得る事を証明し更に琥珀酸の場合には中間体の関与を必要とせず直接硝酸還元酵素と反応して,



に従う事を示した. 何れにしても硝酸還元酵素は脱水素酵素と密接な関係を持ち硝酸塩を直接或は間接の水素受容体とする一種の脱水素酵素と考える事が出来る. 換言すると硝酸塩が終局の水素受容体として作用する脱水素酵素反応を硝酸還元酵素作用と見る事が出来る. 上記抽出処理によつて作用力が減少する原因の一つとして, 組織内に含有される種々の水素供与体或は中間伝達体が除去されるため, 此のやうな基質を反応系に加えると作用力は或る程度恢復し関連する脱水素酵素が推定出来る. 而して生体内成分中脱水素酵素

の水素供与体として考えられるのは先づ C_1 -デ・カルボン酸系或は TCA サイクル等に属する酸類若くは各種の糖類であつて、実際に之等を基質とする多数の脱水素酵素が発見されている。

そこで5齡蚕生体組織並に3齡蚕アセトン粉末をそれぞれ M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で2回抽出した残渣の再懸濁液即ち残渣酵素液-2 を用い NO_3^- と等量即ち $10^{-2}M$ 水素供与体 (NaOH で中和) を加えて反応させた所、予期の通り著しい恢復作用が見られ作用力の減退の原因の一つに水素供与体の除去がある事が確かめられた (第2表, 第3表)。照

第2表. 酸類添加の効果 (生体組織).

$10^{-2}M NO_3^-$, $10^{-2}M H^-$ 供与体, pH 7.4, 35° , 20 h, 酵素量 0.5 g.

酵 素 液	添 加 基 質	生成 NO_3^- , $\times 10^{-2}M$	比
原 酵 素 液	無	0.77	
	林 檎 酸	1.00	
残 渣 酵 素 液 -2	無	0.015	100.0
	林 檎 酸	0.134	893.3
	乳 酸	0.078	520.0
	酒 石 酸	0.050	333.0
	マ レ イ ン 酸	0.045	300.0
	フ マ ー ル 酸	0.028	186.7
	琥 珀 酸	0.022	146.7
	枸 櫞 酸	0.019	126.7
	葡 萄 糖	0.017	113.3

第3表. 糖類添加の効果 (アセトン粉末).

$10^{-2}M NO_3^-$, $10^{-2}M H^-$ 供与体, pH 7.4, 35° , 20 h, 酵素量 0.05 g.

酵 素 液	添 加 基 質	生成 NO_3^- , $\times 10^{-2}M$	比
原 酵 素 液	無	0.39	
残 渣 酵 素 液 -1	無	0.36	
残 渣 酵 素 液 -2	無	0.17	100.0
	果 糖	0.52	305.9
	ガ ラ ク ト ー ズ	0.36	211.8
	蔗 糖	0.31	182.4
	マ シ ノ ー ズ	0.27	158.8
	キ シ ロ ー ズ	0.23	135.3
	葡 萄 糖	0.20	117.6

井氏は *Asp. oryzae*, *Asp. niger* の耐久製品に就て, Succino-, Fumarico-, Tartarico-, Citrico-, Malico-, Malonico, Lactico-, Buthylico-, Formico-, Oxalico-, β -Oxybuthylico-, 及び Hexosemonophosphate-dehydrogenase を証明したが家蚕生体組織に就ては第2表に示すように、林檎酸、乳酸、マレイン酸、フマル酸、琥珀酸、枸櫞酸、葡萄糖の各脱水素酵素が関与しその効果は上記順序であつた。特に林檎酸は非常に強

く各種の水素供与体が混在する原酵素液のみに就て即ち本来含有される水素供与体によつて NO_2 の 77% が NO_2 に還元されたが、之に等量の林檎酸を加えた所殆ど完全に NO_2 に変化した。糖類に関してもアセトン粉末に就て果糖、ガラクトース、蔗糖、マンノース、キシロース、葡萄糖の順である事は第 3 表に示す通りである。

併し以上の実験は照井氏の場合をも含み反応時間が長いため、添加した水素供与体が夾雑する酵素によつて種々の変化を被る事は容易に考えられ、その第 1 次、第 2 次…反応生成物から初めて硝酸還元性という受容体特異性を持つ脱水素酵素を介して水素が硝酸塩に与えられる事もあり得るわけで作用力の復活を示す各物質の脱水素酵素が直接関与しているとは断定出来ない。更に推測を許されるならば例えば枸橼酸……—琥珀酸—フマル酸—林檎酸と TCA サイクルに従つて変化し林檎酸脱水素酵素を介して初めて硝酸塩との関連性を持つに至ると考える事も第 2 表に示す恢復作用の順序と比べ無理ではない様にも思はれる。糖類に就ても葡萄糖より果糖への転換、蔗糖の加水分解更に磷酸の関与も照井氏の Hexosemonophosphate-dehydrogenase 存在の主張や實際水懸濁液よりも磷酸懸濁液に於て作用力の強く現はれる事などからも考えられる。此の外直接には無関係の他の酵素例えば蛋白分解酵素によつて、組織蛋白により生じたアミノ酸が介入する事も考えられ現象を益々複雑にする。従つて照井氏のように直ちにそれぞれの基質の脱水素酵素が関与すると断定する事は甚だ危険であるが、前記諸物質の添加によつて反応力が増強される以上、仮令間接的にせよ水素供与能は否定出来ない。

従来照井氏の方法に倣つてトルオールで液面を被覆して酸素との接触を遮断して反応させてきたが、その効果は不十分であつて短時間の場合には満足な結果が得られなかつた。従つて Thunberg 管を用い排気後作用させた所従来より NO_2 の生成量は少いが十分作用力は認められた。即ち 5 齡第 1 日脱皮直後の P-22 種 12 頭より得た組織 2g より常法に従つて 5 cc 当り 0.5g 若くは相当量を含有するように殺菌水で調製した各酵素液（抽出酵素液は原酵素液を 2500 r.p.m に 5~10 分間遠心分離して得た濁濁上澄液を原量に復したるもの）に就て 10^{-2}M NO_3 , Thunberg 管中で排気後 40° に 2 時間反応させ、光電比色計を用いて生成した NO_2 を測定した。第 4 表はその 1 例であるが第 1 表と全く類似した値を示し抽出効果に関する限り反応時間の長短は問題でない事が見られた。

第 4 表. 抽出効果 (短時間反応).
 10^{-2}M NO_3 , 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g Thunberg 管.

酵 素 液	原 酵 素 液	抽 出 酵 素 液	残 渣 酵 素 液-1	残 渣 酵 素 液-2
生成 NO_2 , $\times 10^{-5} \text{M}$	3.7	±	0.84	0.29
比	100		22.7	7.8

此のように上記条件で十分酵素力を測定出来る事が認められたので再び水素供与体の影響を検討した。同様に P-22, 5 齡蚕組織より調製した残渣酵素液-2 に NO_2 及びそれと同量即ち 10^{-2}M の水素供与体を加えて Thunberg 管内で脱気後 40° 2 時間反応させた。酵素剤として何れも 5 齡蚕を用いたので NO_2 の生成が少く(註)、個々の数値を厳密には比較出来ないにしても、光電比色計を使用しているので従来値よりは精度も高い。第 5 ~

7表に示す様に此の場合も反応時間22時間の際と同じ傾向を示し酵素力の回復率から考慮して少くとも酸類に於ける林檎酸、マレイン酸、琥珀酸、マロン酸、糖類に於ける果糖並びに蔗糖、其の他グルタミン酸及びアスパラギンの水素供与能は確實であつて、反応時間の短い事と考へ併せて之等の脱水素酵素は硝酸還元酵素作用に直接関与し得ると思はれる。一方アセトアルデヒド及びエタノールは逆に阻害作用を示し Bernheim 及び Dixon 両氏が主張したアルデヒド酸化酵素の関与は家蚕組織には起らない事は明白である。尙家蚕の酵素力は齢のみでなく日によつても非常に変動するので、同一酵素剤を用いた試験の結果を同一の表に記載した。

第5表. 水素供与体添加の効果(1).

10^{-2} M NO_3 , 10^{-2} M 水素供与体, 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

添加水素供与体	無添加	林檎酸	マレイン酸	琥珀酸	マロン酸	フマル酸
生成 NO_2 , $\times 10^{-5}$ M	0.11	0.40	0.37	0.23	0.23	0.13
比	100	363.3	336.3	209.1	209.1	118.2

第6表. 水素供与体添加の効果(2).

10^{-2} M NO_3 , 10^{-2} M 水素供与体, 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

添加水素供与体	無添加	果糖	蔗糖	マンノース	キシロース	ラムノース	葡萄糖
生成 NO_2 , $\times 10^{-5}$ M	0.12	0.27	0.22	0.18	0.18	0.14	0.14
比	100	225.0	183.3	150.0	150.0	116.7	116.7

第7表. 水素供与体添加の効果(3).

10^{-2} M NO_3 , 10^{-2} M 水素供与体, 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

添加水素供与体	無添加	グルタミン酸	アスパラギン	アセトアルデヒド	エタノール
生成 NO_2 , $\times 10^{-5}$ M	0.28	2.05	0.84	0.12	0.08
比	100	732.0	300.0	53.0	29.0

(註. 家蚕硝酸還元酵素は4令に於て強く5令蚕では非常に弱い事、又4令でも日によつて変化する事が判つた).

総 括

1. 家蚕硝酸還元酵素は水又は磷酸緩衝液で磨碎抽出されないが作用力の低下は免れない。その低下度は生体組織に於てアセトン粉末よりも著しい。
2. 抽出による作用力低下の原因の一つとして水素供与体の除去に基く事が確認された。
3. 水素供与体を反応系に添加する事により抽出残渣の酵素力は或る程度回復されるが、その効果は35' 20時間の場合、酸類では林檎酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、琥珀酸、枸橼酸の順であり、糖類に於ては果糖、ガラクトース、蔗糖、マンノース、

キシロース, 葡萄糖の順であつた。

4. 従来トルオール被覆下に長時間反応させていたが, Thunberg 管を用いて2時間で十分である事が確認された。此の場合抽出処理による作用力の減退は長時間の際と同一傾向を示した。又水素供与体も林檎酸, マレイン酸, 琥珀酸, マロン酸, フマール酸, 並びに果糖, 蔗糖, マンノース, キシロース, ラムノース, 葡萄糖の順に活性作用を示したが, 特に最も強いのはグルタミン酸次いでアスパラギンであつた。他方アセトアルデヒド及びエタノールは逆に阻害作用を示した。

5. 35° 20時間及び 40° 2時間の両方法による結果より少くとも林檎酸, マレイン酸, 琥珀酸, マロン酸, 果糖, 蔗糖, グルタミン酸及びアスパラギンの各脱水素酵素は硝酸還元酵素作用に直接関与し得る事が判明した。

終りに実験に協力された三浦道雄, 高橋平八郎両氏に厚く感謝する。

文 献

Bernheim, F. & Dixon, M. (1928) : *Biochem. J.*, **22**, 125.

江上不二夫, 佐藤 了 (1948) : *日化*, **69**, 160.

照井幾造 (1936) : *醸造*, **14**, 233.

山県春次 (1936) : *Acta Phytochim.*, **10**, 283.

S u m m a r y

It was observed that the nitrate reductase of silk-worm was not extracted with water or phosphate buffer by grinding but decreased the activity, for example in case of living tissue the activity of the residue once extracted was about 28 % of that of the original enzyme suspension and 8.8 % in the twice-treated one. In acetone powder, though the grade of the diminution of the enzymic action was small, e. g. to about half by twice extraction, the effect of extraction on the nitrate reductase had the same tendency. It is very probable that the decrease of the enzymatic activity by extraction may be explained in part as due to the removal of some substances which provide hydrogen to nitrate by catalytic action of proper dehydrogenase coexisting in the enzyme preparation. I assumed that when a hydrogen donator was furnished, the enzymic action must have been activated to some extent and the dehydrogenase concerned would be decided. Therefore, the same quantity of substances as the NO₃ to be reduced was added to reaction mixture and the NO₂ produced was determined. The restoration of activity of tissue which was extracted two times was attained according to the order in the following table.

H-donator added	No added	Malic	Lactic	Tartaric	Maleic	Fumaric	Succinic	Citric
Relative activity	100	893.5	520.0	333.0	300.0	186.7	146.7	126.7

and in case of sugars by acetone powder :

H-donator added	No added	Fructose	Galactose	Sucrose	Mannose	Xylose	Glucose
Relative activity	100	305.9	211.8	182.4	158.8	135.3	117.6

However, from the results in these studies there is reason to assume that the reactivation would be attained by other compounds which were reaction products of the substances added by other enzymes because the reaction time was 22 hrs which was too long to estimate the effects of H-donators. I tried, therefore, to use the Thunberg's tube in which NO_3 and enzyme solution were mixed after careful evacuation so as to shorten the reaction time and allowed the reaction to proceed at 40° for 1 to 2 hrs. It was found that these condition were satisfactory. In this circumstance that the effect of extraction was also the same as that in long reaction period was shown.

H-donator added	No added	Malic	Maleic	Succinic	Malonic	Fumaric	Fructose	Sucrose
Relative activity	100	363.6	336.3	209.1	209.1	118.2	225.0	183.3
Mannose	Xylose	Rhamnose	Glucose	Glutamic	Asparagine	Acetaldehyde	Ethanol	
150.0	150.0	116.7	116.7	732.0	300.0	53.0	29.0	

It may be said that malic-, maleic-, succinic-, malonic-, fructose-, sucrose-, glutamic-, and asparagine-dehydrogenases were concerned to the nitrate reduction in the silk-worm.