

廿日鼠及び牛肝臓の硝酸還元酵素

大村, 浩久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21316>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 14 (3), pp.423-434, 1954-03. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

廿日鼠及び牛肝臓の硝酸還元酵素

大 村 浩 久

The nitrate reductase of maus and ox-liver

Hirohisa Omura

緒 言

硝酸還元酵素が生物体内に於ける窒素同化の過程に於て重要な役割を演ずる事は、特に硝酸塩を主要窒素源とする植物並びに微生物に就ては重視されるが、無機窒素を同化し得ないとされている動物に於ては困難である。併し各種動物の肝臓、鼠の筋肉等には硝酸還元酵素は認められて居り、更に牛乳の xanthine oxidase, aldehyde oxidase 等も硝酸塩を還元し得る事は知られている。動物に由来する之等の酵素は硝酸還元性という受容体特異性を持つ脱水素酵素の一種であるか又は之と密接な関係を持ち、何れの場合にも硝酸塩は水素受容体として作用すると考えられる。江上氏 (1950) は大腸菌、牛肝臓の酸素吸収が硝酸塩で促進される場合には硝酸還元酵素が関与している事を明らかにし、硝酸—硝酸還元酵素が単に終局の水素受容体としてだけでなく或る種の細胞呼吸に於ける中間酸化触媒として作用するとし、所謂硝酸塩呼吸としての機能を強調している。一方家蚕に硝酸塩、亜硝酸塩を添食した場合蚕体内オキシム含量の増大する事 (山藤, 吉原, 和田, 1950)。或は亜硝酸塩を主要窒素源として飼育された廿日鼠の内臓オキシムも同様に増加する事 (山藤, 大村, 1952) は正常代謝に依るか又は特に無機窒素が過剰に与えられた異常状態に於て初めて現われる現象かは断定出来ないが、少くとも昆虫類或は高等動物に於ても無機窒素の同化が起り得る事を示し、硝酸還元酵素が之に関与している事が推定される。従つて家蚕に就いて先ず当教室に於て動物試験に用うる廿日鼠並びに動物酵素剤として最も広く一般に使用される牛肝臓の硝酸還元酵素に就て概略の性質を検討した。

実 験

I. 廿日鼠。従来エーテル又はクロロホルムで麻酔した後解剖していたが、麻酔剤の酵素に影響する懸念もあり、且は個体が小さくて屠殺も容易であるので麻酔剤の使用を避け、生きたまま頸動脈を切つて出血死に至らしめ直ちに内臓 (心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓) を摘出しよく水洗後之等と一緒に内臓酵素剤とし、比較的少量得られ易い筋肉だけは別にして後肢より採つた。

(1) 酵素作用の確認。内臓及び筋肉を採取洗滌後直ちに少量の石英砂及び pH 7.4 の M/15 磷酸緩衝液と研碎調製した 10% (w/v) 懸濁液 5 cc と 2×10^{-2} M NaNO_3 5 cc とを Thunberg 管内で排気後混合し 40° に一定時間反応させた後常法に従つて生成 NO_2 を測定した。盲験区には 100° に 5 分間浸漬した加熱酵素液を用いたが、第 1 表に示す様

に内臓筋肉共に酵素作用が認められ、且つ反応は上記条件即ち 10^{-2} M NO_3 , 酵素量 0.5g, Thunberg 管中排気後 40° 2 時間で十分である事が判つたので以後特別の場合の外此の条件で行つた。

第 1 表 反 応 時 間 の 影 響
 10^{-2} M NO_3 , pH 7.4, 40° , 酵素量 0.5g, Thunberg 管.

酵 素 剤	内 臓			筋 肉	
	1	2		2	
反 応 時 間 時 間	試 験	試 験	盲 験	試 験	盲 験
生成 NO_3 , $\times 10^{-5}$ M	0.92	3.20	0	1.96	0

(2) 抽出処理の影響。次に家蚕に於けると同様に内臓並びに筋肉を磨碎抽出しその酵素力に就て第 2 表の結果を得た。即ちそれぞれ 2g を石英砂を加えて乳鉢中で十分磨碎し水を加えて 20 cc 懸濁液とした(原酵素液)。15 cc を 2500 r.p.m. に 5 分間遠心分離し上澄液を旧量に復す(抽出酵素液)。同じく残渣も再び磨碎しながら水に再懸濁 15 cc とし残渣酵素液-1 とする。以下同様に処理して残渣酵素液-2, 残渣酵素液-3 等と呼ぶ。

第 2 表 廿 日 風 抽 出 効 果
 10^{-2} M NO_3 , pH 6.0, 40° , 2 h, 酵素量 0.5g, Thunberg 管.

		原酵素液	抽 出 酵 素 液	残 渣 酵 素 液-1	残 渣 酵 素 液-2	残 渣 酵 素 液-3
		内 臓	生成 NO_3 , $\times 10^{-5}$ M	2.92	—	2.13
	比	100	—	72.6	58.5	—
筋 肉	生成 NO_3 , $\times 10^{-5}$ M	1.48	0.94	0.63	0.52	0.48
	比	100	63.5	42.6	35.1	32.4

試験には之等の酵素液 5 cc 宛を使用したが何れも酵素剤 0.5g 若くは之に相当する量を含む。内臓は 1 回で 70%, 2 回抽出によつても半分以上の活性を保持したが筋肉では 1 回で既に 40%, 2 回で 35% に減じそれ以後は大體一定したが、家蚕組織と異つて抽出液に約 60% の作用力が認められた。Bernheim, Dixon 両氏 (1928) は肝臓筋肉共に細刻した後繰り返し洗つても容易に水で洗い出されない事を報告しているが、石英砂と共に磨碎し細胞膜を破壊する事は行つていないし又抽出液に就ての試験も無く、定性的域に止つている。

(3) 水素供与体。家蚕同様抽出による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は、内臓の残渣酵素液-2 に就て水素供与体の影響を検討した第 3 表の結果から確認されるが家蚕の場合とは異つて、枸橼酸 > 琥珀酸 > 林檎酸 > 乳酸の順に何れも約 50% 前後の作用力増加を示して略々原酵素液の活性近く迄恢復している。続いて酒石酸 > フマル酸 > α -ケトグルタル酸の順ではあるが殆ど影響なく、焦性葡萄糖及びマレイン酸を添加した場合には却て作用力は低下し阻害効果を示した。糖類ではガラクトース > ラムノース > マンノース > 果糖 > 葡萄糖の順であつて、家蚕組織で好結果を与えた蔗糖はキシロ

第3表. 水素供与体添加の効果.
 10^{-2} M NO_3 , 10^{-2} M H-供与体, pH 6.0, 40° 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

酵 素 液	添加水素供与体	生成 NO_2 , $\times 10^{-5}$ M	比
原 酵 素 液	無 添 加	2.70	
残 渣 酵 素 液-1	無 添 加	1.96	
残 渣 酵 素 液-2	無 添 加	1.58	100.0
	枸 櫞 酸	2.50	158.2
	琥 珀 酸	2.46	155.7
	林 檎 酸	2.38	150.6
	乳 酸	2.34	148.0
	酒 石 酸	1.70	107.6
	フ マ ー ル 酸	1.54	97.3
	α ケ ト グ ル タ ル 酸	1.49	94.0
	焦 性 葡 萄 酸	1.28	81.3
	マ レ イ ン 酸	1.17	74.3
	ガ ラ ク ト ー ズ	2.63	166.7
	ラ ム ノ ー ズ	2.37	150.0
	マ ン ノ ー ズ	2.26	143.1
	果 糖	2.02	127.8
	葡 萄 糖	1.76	111.1
蔗 糖	1.47	93.0	
キ シ ロ ー ズ	1.39	88.0	

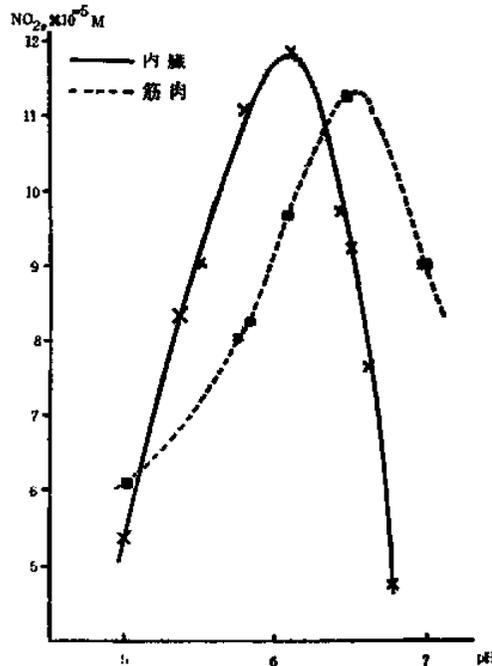
ーズと共に寧ろ阻害的に作用した。而して短時間の反応であるのでそれぞれの基質から直接若くは中間体を経て水素が与えられると考える事が許されるならば少くとも廿日鼠内臓では Citrico—, Succino—, Malico—, Lactico—, Galactose—, Rhamnose—, Mannose-dehydrogenase が硝酸還元作用に関与していると云う事が出来る。特に糖類に於て体内代謝の中間体として最も広く出現を予想される葡萄糖或は果糖よりはガラクトース, ラムノーズ並びにマンノーズに強い効果が認められるのは興味を感ずる。此のように動物の種類によつて基質効果の序列が異なる事は、同じ大腸菌でも菌株によつて異なる事実(村上, 1949) からも推定出来る。又特に焦性葡萄糖が阻害作用を示す事はアセトアルデヒドが殆ど影響しない点(大村, 未発表)と考へ併せ Bernheim, Dixon 両氏の肝臓製品が両者により促進される事及びアセトアルデヒドの阻害作用を持つ江上氏等(1950)の牛肝臓製品とも異つた基質特異性を示した。

(4) 最適 pH. 組織 0.5g を含有するように従来よりは稍、稠密に水に磨碎懸濁した原酵素液 3 cc に M/10 緩衝液 5 cc, 5×10^{-1} M NaNO_3 2 cc を Thunberg 管内で脱気後混合し 40° 2 時間反応させて生成 NO_2 量を比較した所、内臓に於ては pH 6.0~6.2, 筋肉では 6.5 附近に最適 pH のある事が見られた(第1図)。酵素能は第4表に示すように緩衝液の種類によつても異なるので pH 5—6.2 を醋酸—醋酸ソーダ, 5.8—7.0 の間は磷酸塩を用い境界部は重複させた。醋酸塩も水素供与体として作用し得る事が推測されるが、

第 4 表. 緩衝液の種類による作用力の相異.
 10^{-1} M NO_2 , 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

組 織		内 臓		筋 肉	
pH		5.8	6.1	5.5	6.1
生成 NO_2 , $\times 10^{-5}$ M	磷酸塩	11.11	11.94	0.62	0.91
	醋酸塩	18.68	19.05	1.17	1.39

事実同一 pH に於ては醋酸緩衝液に於て磷酸塩の場合よりも作用力が強く現われたので図では磷酸塩に補正した. 江上氏等の精製標品は大腸菌, 肝臓共に pH 7.4 附近に最大値を



第 1 図 廿日鼠酵素の最適 pH
 10^{-1} M NO_2 , 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管

持つが単なる磨碎物である粗酵素品では生体同様に各種の基質を組織に従つて種々の量に含有し更にそれぞれに応じた脱水素酵素が関与するので之等の総合された結果を示すわけで精製品よりも生体内の現象に近く反映するのではないかと考へられる. 内臓磨碎物の pH も 6 附近であつて最適 pH の値とほぼ一致する事は, 生物組織内の状態は反応に都合の良い状態にある事を暗示するのではないかと考へる.

(5) 分布. 廿日鼠の体軀が小さいため従来内臓として一括使用して来たが一応その分布を見て置く事も必要であつた. 廿日鼠 3 頭より心臓 0.5 g, 肝臓 5.5 g, 腎臓 1.2 g, 脾臓 0.5 g, 肺臓 0.5 g, 後脚筋肉 1.2 g を採りそれぞれ石英砂及び水で 10% (w/v) 磨碎懸濁液を調製し各組織に含まれた基質其の他の諸因子をも考慮した各器官 0.5 g 宛の酵素

力を比較検討したが、第5表に示すように、肝臓に於て著しく強く筋肉及び腎臓にも検出されたが肺臓並びに脾臓には認め得なかつた。尙此の場合 NO_2 の測定には光電比色計を使用した。

第5表. 廿日鼠に於ける酵素の分布.
 10^{-2}M NO_2 , 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

器	官	心 臓	肝 臓	腎 臓	脾 臓	肺 臓	筋 肉
生成 NO_2 , $\times 10^{-6} \text{M}$		+	1.76	0.19	0	0	0.26

II. 牛肝臓

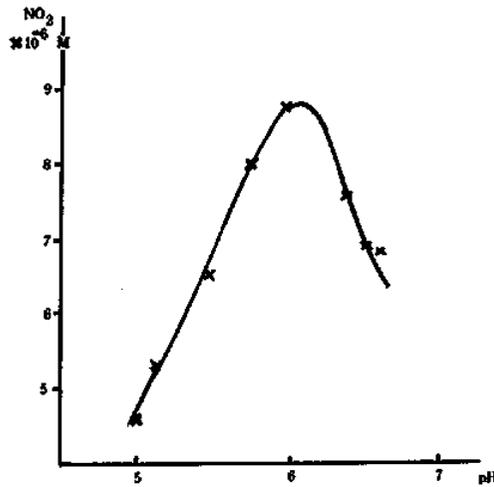
(1) 作用力の確認並びに抽出効果. 廿日鼠の場合と同様 5 cc 当り 0.5 g 若くは相当量を含有するように水で磨碎抽出処理を施した酵素液に就て作用力を検討した所明らかに酵素力が確認されると共に、第6表に示すように家蚕組織、廿日鼠内臓更に筋肉と又異つた特性を示し石英砂及び水とよく磨碎し 2500 r.p.m. に 10 分間遠心分離すれば酵素力の大部分は濁濁上澄液に移り残渣では殆ど NO_2 の生成は見られなかつた。然も此の作用力

第6表. 牛肝臓抽出効果.
 10^{-2}M NO_2 , 10^{-2}M H- 供与体, pH 6.6, 40° , 酵素量 0.5 g, Tunberg 管.

酵 素 液	反応時間	添加水素供与体	生成 NO_2 , $\times 10^{-6} \text{M}$	比
原 酵 素 液	1	無 添 加	0.43	31.6
	2	無 添 加	1.36	100
抽 出 酵 素 液	2	無 添 加	1.22	90
残 渣 酵 素 液 -1	2	無 添 加	+	
残 渣 酵 素 液 -2	2	無 添 加	±	
		マ ロ ン 酸	±	
		グ リ シ ン	±	
		ラ ム ノ ーズ	±	
残 渣 酵 素 液 -3	2	無 添 加	±	

の低下は酵素自体の除去に基くもので単に水素供与体が完全に抽出されたためではない事は水素供与体としての能力の高い(後述)ラムノーズ, グリシン, マロン酸等を残渣酵素液に加えても作用力は復活しない事からも明白である。尙5分間沸騰水に浸漬加熱した酵素液を用いた盲験では何れの場合にも勿論 NO_2 の還元は起らなかつた。本試験に於ける抽出酵素液も蛋白膠質液であつて、酵素が文字通り抽出されたのか 2500 r.p.m. に 10 分間遠心分離しても沈下しない小粒子に結合した状態に止つているのかは断定出来ず、誤解を招き易いが便宜上抽出液として記述した。

(2) 最適 pH. 廿日鼠の際と同じく江上氏等とは異つて磨碎液の pH 6 附近に最適値を示し、生物組織は反応に適した状態にあるとの推測を更に支持する(第2図)。



第 2 図. 牛肝臓酵素の最適 pH

10⁻² M NO₃, 40° 2h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管

(3) 水素供与体. 肝臓では酵素も水素供与体も共に抽出液中に来るので両者を分ける事は出来ないが, 特定の基質を過剰に加えて反応が促進されるならば少くもその基質に関する脱水素酵素は関与していると考えてよい. そこで常法通り 0.5 g 相当量を含む抽出酵素液を用い NO₃ の 5 倍量即ち 5 × 10⁻² M の水素供与体を加えて脱気後 40° 2 時間反応させた結果を第 7 表に示すが, 表中琥珀酸 + マロン酸区は半量宛即ち 2.5 × 10⁻² M 宛加へ両者を合せて他の水素供与体と等しくなるようにした.

第 7 表 水 素 供 与 体 の 影 響

10⁻² M NO₃, 5 × 10⁻² M H-供与体, pH 6.0, 40°, 2h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管.

酵 素 液	原酵素液		抽 出 酵 素 液						
	添加基質	無添加	ラムノーズ	ガラクトーズ	マンノーズ	葡萄糖	果糖	マンニット	
生成 NO ₃ × 10 ⁻⁵ M		1.29	0.72	1.07	0.97	0.90	0.87	0.82	0.80
比		176.4	100.0	148.3	134.5	125.0	120.7	113.8	111.8
抽 出 酵 素 液									
琥珀酸	マロン酸	琥珀酸 マロン酸	枸橼酸	グリシン	アラニン	アスパラギン	アセトアルデヒド	エノール	アスコルビン酸
1.94	1.38	1.54	0.65	1.44	1.06	2.28	5.84	3.12	0
269.0	191.7	213.4	89.7	200.0	147.2	316.8	808.0	433.8	0

糖類ではラムノーズが最も強くガラクトーズ > マンノーズ > 葡萄糖 > 果糖と続き糖アルコールであるマンニットも約 10% の促進作用を示した. 此の場合にも上位 3 者が廿四鼠内臓に於けると同様広く出現を予想される葡萄糖若くは果糖ではなくてラムノーズ, ガラクトーズ及びマンノーズであつた. 琥珀酸脱水素酵素の特異的阻害剤であるマロン酸単独

の水素供与能も相当強くマロン酸脱水素酵素の存在を暗示するが、琥珀酸の効果も勿論更に強く両者を半量宛混合した場合はその中間であつた。琥珀酸添加区に於ける硝酸還元が琥珀酸脱水素酵素作用によつて提供された水素により行われると考えると、マロン酸の添加で NO_2 生成は減少しているので琥珀酸脱水素酵素は阻害されたと見られるわけでも何等矛盾しない。若し或る脱水素酵素が硝酸還元能という受容体特異性を持つてゐるならば基質による硝酸還元酵素作用の促進を以て脱水素酵素作用力判定の一基準ともなし得るかと思われ、 10^{-5}M 或はそれ以下という微小能力をも現わす事が出来るだろう。其の他の酸類に就ては同一の試料で正確な値が得られなかつたので他の機会に譲るが、廿日鼠内臓で最高の復活効果を示した枸橼酸は逆に阻害的に作用した。アミノ酸類ではグリシン、アラニン共に有効でありアスパラギンも亦良好な水素供与体であつた。特にアセトアルデヒド及びその還元生成物エタノールによる作用力の増強は著しく Bernheim, Dixon 両氏の主張した様にアルデヒド酸化酵素の存在を裏書きするものであつて、江上氏等と相反する。一方ホルムアルデヒド、メタノール系列はグリース試薬で白濁を生じ正確な測定値は得られなかつたが、概略影響は及ぼさない様であつた。

之等の水素供与体の中、代表的なラムノース、琥珀酸、アセトアルデヒドと共に阻害効果を示した枸橼酸の添加量の関係を求めた。第8表には添加量を変えて生成した NO_2 量を無添加区に於ける NO_2 生成量を 100 とする相対値で示した。

第8表 水素供与体添加量の関係。
 10^{-2}M NO_3 , pH 6.0, 40° , 2 h, 抽出酵素液 0.5 g, Thunberg 管。

添加量 $\times 10^{-2}\text{M}$	10.0	5.0	4.0	2.0	1.0	0.1	0.01	0.001	0.0001
ラムノース	298.4	176.8	108.7	100.0	100.0	—	—	—	—
枸橼酸	85.3	89.7	97.1	108.8	127.9	—	—	—	—
琥珀酸	240.0	268.0	248.0	264.0	200.0	—	—	—	—
アセトアルデヒド	800.0	800.0	800.0	800.0	800.0	800.0	200.0	120.0	80.0

ラムノースは NO_3 の2倍量迄は酵素液中に本来含まれている水素供与体の存在のためか影響なく、4倍添加する事によつて初めて促進効果を若干示すに至り爾後添加量の増加に伴つて効果も大きくなる。従つて当初5倍量の水素供与体を加えた事は無意味ではなく、若し家畜或は廿日鼠に就つて NO_3 と等量加えていたならばラムノースの効果は見出されていなかつたであらう。琥珀酸は2倍程度で或る限界に達するらしく NO_3 と等量でも尙かなりの促進作用を示し酵素固有の水素供与体に比して優先して脱水素酵素の作用を受けるとも考えられる。アセトアルデヒドは非常に強力な促進効果を持ち NO_3 の1/10量で既に極大値に達しそれ以上加えても効果は増加しない。而して NO_3 の1/100 即ち 10^{-5}M 迄促進しているが此の時の NO_2 の生成量即ち NO_3 の還元量は $0.3 \times 10^{-5}\text{M}$ であつた。此の促進作用は勿論 Bernheim, Dixon 両氏のアルデヒド酸化酵素によると思はれるが、他の脱水素酵素の作用する余地を与えず特に優先する事を示すものと思われる。一方枸橼酸は添加量の減少に伴つて阻害効果も減殺され NO_3 と等量若くは2倍量では却て促進的になつてゐる。所がグリース試薬による NO_2 の呈色は第9表のように枸橼酸によ

つて妨害される事が判つたので真の NO_2 濃度 = $\frac{\text{測定値}}{\text{呈色率}}$ によつて補正すると第 8 表の値は第 9 表に示すようになり、 NO_3 還元に及ぼす枸橼酸の阻害効果は實際は単なる NO_2 呈

第 9 表 枸 橼 酸 の 影 響 補 正。

枸橼酸濃度 $\times 10^{-2} \text{M}$	10.0	5.0	4.0	2.0	1.0
呈 色 率	0.78	0.86	0.93	1.01	1.0
測 定 値	85.3	89.7	97.1	108.8	127.9
補 正 値	108.8	102.9	104.4	107.4	127.0

色の妨害であつて、酵素作用へは寧ろ促進的に働いているように思われる。此のように生成 NO_2 の判定を妨害するため外観上酵素作用を阻害するかの結果を示す物質の他の好例はアスコルビン酸であつて、第 7 表に示すように NO_2 の生成が見られず一応完全に酵素作用を阻止するように思われるが、反応条件に従つて $5 \times 10^{-2} \text{M}$ のアスコルビン酸を含有する $2 \times 10^{-3} \text{M}$ NaNO_2 水溶液はグリース氏試薬によつて全く呈色しなかつた。アスコルビン酸が NO_2 を破壊するか又はグリース氏試薬と反応して NO_2 の呈色を阻止するので、 NO_3 の還元にも影響するか否かは判定出来ない。従つて Green 氏等 (1934) が硝酸還元酵素反応に於ける中間伝達体の検索に際して否定的結果を得ているが、或は原因が此のような点にあるのかも知れない。

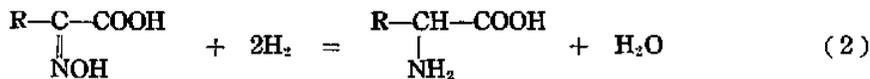
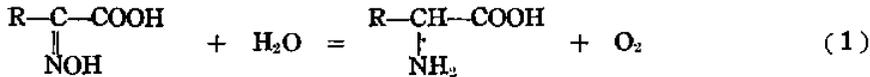
(4) カルボニール化合物及びそのオキシムの影響。アセトアルデヒドが特に著しい促進効果を示し Bernheim, Dixon 両氏のアルデヒド酸化酵素の役割を強調する結果と一致し江上氏等の場合と相反した。アセトアルデヒドは酸化されて醋酸を生じ還元されるとエタノールに変化する。若し前者が起れば水素を与えて促進的に作用し後者であれば同様に水素受容体として作用するために硝酸還元を拮抗的に阻害する事になり、此の何れが起るかは酵素製品に共存する関係酵素に支配されると思われる。此のようにアセトアルデヒドのみならず焦性葡萄糖や α -ケトグルタル酸のようなケト酸も生体内代謝現象の中間体として極めて重要な役割を演ずるので之等の影響を更に検討した。常法通り抽出酵素液に NO_3 の 5 倍量のカルボニール化合物並びにそのオキシムを加えた。カルボニール化合物としては純ケトンとして最も簡単なアセトン、ケト酸として生理的に重要な焦性葡萄糖及び α -ケトグルタル酸、アルデヒドとしてアセトアルデヒドの 4 種を選び同時にそれぞれのオキシムを用いた。第 10 表にその結果を示すがアセトンは殆ど影響せず焦性葡萄糖は強い阻害作用を示したが、同じく中間体として同様に重要な作用を持つ α -ケトグルタル

第 10 表. カルボニール化合物並にオキシムの影響。

10^{-2}M NO_3 , $5 \times 10^{-2} \text{M}$ 供与体, pH 6.0, 40° , 2 h, 酵素量 0.5 g, Thunberg 管。

添加物質	無添加	アセトン	アセト オキシム	焦 性 葡萄糖	焦性葡 萄酸オ キシム	α -ケ トグル タル酸	α -ケ トグル タル 酸オキ シム	アセト アルデ ヒド	アセト アルド キシム
生成 NO_2 , $\times 10^{-6} \text{M}$	0.96	0.91	1.44	0.30	0.60	1.37	0.55	6.23	0.65
比	100.0	94.8	150.0	31.3	63.3	142.7	55.6	648.6	67.6

酸は賦活作用を持つ。アセトアルデヒドは勿論強力な促進作用を示すが之等のオキシムは何れもそれ等の作用を減殺する傾向を持ち促進的に作用したアセトオキシムは別として、生理的意義を持つ焦性葡萄糖、 α -ケトグルタル酸、アセトアルデヒドの各オキシムは何れも阻害効果を及ぼす事は注目すべきである。先に当教室（山藤，1950；山藤，川上，篠原，1952）に於てオキシムよりアミノ化合物への転移を触媒する酵素が発見されオキシマーゼと命名されたがその変化機構に関しては一応次の2式が考えられる。ケト酸オキシムを例とし、



一方硝酸還元作用は



に従うが茲で H_2 は再三述べたように水素供与体より脱水素酵素を介して与えられる。若しオキシマーゼが(2)式に従うならば硝酸還元作用と同一の機構が予想され、硝酸還元酵素が硝酸還元性という受容体特異性を持つ脱水素酵素(群)と考えられるようにオキシマーゼも、オキシム還元性を受容体特異性とする脱水素酵素(群)であるとの推測も可能である。硝酸還元酵素とオキシマーゼが全く異なるものであるか或はオキシマーゼ作用は水素受容体としての硝酸塩をオキシムに置換した硝酸還元酵素作用の別の面を示すものであるかは今後の研究に俟つが、何れにしても硝酸塩の受取るべき水素を共存するオキシムが拮抗的に奪いそのため NO_3^- の還元が妨害されると考えてよく、水素供与体の影響は例えばアセトアルデヒドは家蚕に於ては阻害し牛肝臓では著しく促進するように動物によつて異なるが、オキシムの阻害効果は牛肝臓のみならず廿日鼠内臓、家蚕、鶏肝臓等に共通する事からも推定される。

又焦性葡萄糖はアセトアルデヒドに変化して強い促進作用を示すという事を Bernheim, Dixon 両氏は主張しているが、第10表のように廿日鼠と同様に阻害作用を示し之も焦性葡萄糖が脱炭酸されてアセトアルデヒドに変じてから促進効果を及ぼすという事よりも、直接水素受容体として水素を拮抗的に奪つて乳酸を生ずるためと考えられ、動物組織に於けるカルボキシラーゼと乳酸脱水素酵素の分布役割等を考え合わせて寧ろ此の方が普遍的である様に思われる。

総 括

- (1) 廿日鼠内臓及び筋肉並びに牛肝臓に硝酸還元酵素作用を確認した。
- (2) 廿日鼠内臓の硝酸還元酵素力は2回磨碎抽出によつて約1/2に減少し、一方筋肉では約35%が残存し60%は抽出された。此の場合にも減少の原因の一つに水素供与体の除去がある事を確かめた。他方牛肝臓の酵素は大部分抽出された。
- (3) 水素供与体の効果は廿日鼠内臓に就ては、枸橼酸>琥珀酸>林檎酸>乳酸の順に

促進作用を示し酒石酸、フマル酸、 α -ケトグルタル酸は殆ど影響なく焦性葡萄糖及びマレイン酸は阻害的に作用した。一方糖類ではガラクトース>ラムノース>マンノース>果糖の順であつた。又牛肝臓に於ては糖類ではラムノース>ガラクトース>マンノース>葡萄糖>果糖>マンニットの順であり、琥珀酸、マロン酸の外アスパラギン>グリシン>アラニンの順に窒素化合物も有効であるが、最も強力な促進作用を示したのはアセトアルデヒド、続いてエタノールであつた。

(4) 酵素作用の最適 pH は廿日鼠内臓 6.0~6.2, 筋肉 6.5, 牛肝臓 6.0 附近と何れも磨碎液の pH に近い点にあつた。

(5) 廿日鼠の酵素作用は肝臓、筋肉、並びに腎臓に検出され心臓、脾臓及び肺には見出されなかつた。

(6) カルボニール化合物中、アセトアルデヒド及び α -ケトグルタル酸は促進、焦性葡萄糖は阻害的に作用したが之等のオキシムは何れもその影響を減殺する傾向を示し且つ NO_2 の還元を拮抗的に阻害するように思われた。

終りに実験に協力された三浦道雄氏に厚く感謝する。

文 献

- Bernheim, F. & Dixon, M. (1928) : *Biochem. J.*, **22**, 125.
 江上不二夫 (1950) : 酵素化学シンポジウム, **4**, 3.
 江上不二夫, 鈴木旺, 丹羽亮, 佐藤了 (1950) : 日化, **71**, 226.
 Green, D. E., Stickland, L. H. & Tarr, H. L. A. (1934) : *Biochem. J.*, **28**, 1812.
 村上枝彦 (1949) : 酵素化学シンポジウム, **2**, 10.
 山藤一雄 (1950) : *Nature*, **167**, 770.
 山藤一雄, 吉原典子, 和田春子 (1950) : *Enzymologia*, **14**, 170.
 山藤一雄, 川上哲夫, 篠原弘次郎 (1952) : *Enzymologia*, **15**, 199.
 山藤一雄, 大村浩久 (1952) : *Enzymologia*, **15**, 296.

S u m m a r y

Maus-organ (liver, kidney, heart and spleen) and maus-muscle of the hind legs of the same body were repeatedly washed with sterilized water, mixed with small amount of quartz sand, grounded thoroughly in mortar and made up 10% (w/v) suspension with M/15 Sørensen's phosphate buffer solution of pH 7.4. Ox-liver suspension was prepared with water as in the above procedure and its pH was 6.0. 5 cc of each enzyme solution was mixed with 5 cc of 2×10^{-2} M NaNO_2 solution after careful evacuation in Thunberg's tube, placed the tubes in a water bath at 40°. As control, enzyme solution which had been previously heated at 100° for 5 min. was used. After 1 and 2 hrs. the mixture was heated in the same manner to stop the reaction, added a few drops of

conc. acetic acid and centrifuged. The colourimetric estimation of NO_2 formed in the clear supernatant liquid was carried out in the usual way. The results were as follows.

Enzyme material	Maus-organ			Maus-muscle		Ox-liver		
	Time of reaction, hrs.			2		1		2
Conc. of NO_2 formed, 10^{-5} M	test	test	control	test	control	test	test	control
		0.92	3.20	0	1.96	0	0.43	1.36

It can be seen from the data in the above table, that the detectable quantity of NO_2 was produced from NO_3 by the catalytic action of these tissue suspension, in other words, the existence of the nitrate reductase in these tissues was confirmed.

Then the effect of extraction with water on the enzyme activity was studied as for the silk-worm. The aqueous suspension of ground tissue was defined as original enzyme (O-E). A certain volume of O-E was centrifuged and the supernatant fluid restored to original volume with water, and it was called extract-enzyme (E-E) and resuspension of residue having the same volume was named residue-enzyme-1 (R-E-1). The suspension of residue which was extracted two times was residue-enzyme-2 (R-E-2) and so on. Each 5 cc of these enzyme solutions contained 0.5 g tissue or corresponding amounts of residue or extracted matter. In the next table, the relative activity of the nitrate reductase of these enzyme solutions were presented:

		O-E	E-E	R-E-1	R-E-2	R-E-3
Maus	Organ	100	—	72.6	58.5	—
	Muscle	100	63.5	42.6	35.1	32.4
Ox	Liver	100	90.0			

The above table teaches us that the nitrate reductase activity of maus-organ decreased to about half by extracting twice, while that of the muscle of the same animal was extracted about 60 % and 40 % of that retained in residue and by twice-treating about 35 % was involved. To contrast these things, almost whole reductase in ox-liver was entered into extract.

The optimum action of the reductase of both maus-organ and ox-liver occurred at pH 6.0~6.2 which is close to the pH of homogenate of these tissues.

It has been found to increase their activity by addition of various substances. To the reaction mixture with R-E-2 of maus-organ the same quantity of some acids and sugars as nitrate was added. The relative activities were as

follows.

Citric	Succinic	Malic	Lactic	Tartaric	Fumaric	α -Ketoglutaric	Pyruvic
158.2	155.7	150.6	148.0	107.6	97.3	94.0	81.3
Maleic	Galactose	Rhamnose	Mannose	Fructose	Glucose	Sucrose	Xylose
74.3	166.7	150.0	143.1	127.8	111.1	93.0	88.0

On the other hand, the substances which were five times amounts of nitrate were supplied to reaction mixture with E-E of ox-liver because I doubted if the addition of equal quantity of H-donator cause activation, for E-E contained both enzyme and substrate and the effect of substrate added would be hindered. To contrast to maus-organ and silk-worm the restoration of activity was attained according to the following order :

rhamnose, galactose, mannose, glucose, fructose and mannite.

The rate of activation, however, were also within 50% accorded with that of maus. Succinic acid and malonic acid which is specific inhibitor of succinodihydrogenase also had high ability of about 2.7 times and 1.9 respectively and by addition of each half amounts of both acids the rate lied between both. Some nitrous compounds such as glycine, alanine and asparagine caused the stronger reactivation. But the most effective one was acetaldehyde having 8-fold rate and the next its reduction product, ethylalcohol, with 4.3 times. On the other hand, citric acid showed the inhibiting action and in case of addition of ascorbic acid NO_2 was not detected. However, in pure solution citric acid decreased the rate of coloration of NO_2 . Therefore, when one thought over above, it is found that the citric acid also have H-donating capacity even small. NO_2 solution containing ascorbic acid developed no red colour with Griess's reagent.

Now the influences of carbonylic compounds on the enzyme were studied. As seen from data in the table,

None	Pyruvic-acid	Pyruvic-oxime	α -Ketoglutaric-acid	α -Ketoglutaric-oxime
100	31	63	143	56
Acetone	Acetoxime	Acetaldehyde	Acetaldehyde-oxime	
95	150	649	68	

though acetaldehyde and α -ketoglutaric acid acted actively and pyruvic acid inhibitory, oximes of these compounds were inhibitingly. I assumed that these oximes would receive hydrogen from H-donators competitively with NO_2 , therefore, nitrate reductase and oximase, discovered in my laboratory, which catalyze the conversion of oximes to amino compounds, would be the same enzyme.