

無機態窒素代謝サイクルでの次亜硝酸の生成ならびに α -ケトグルタル酸オキシムの合成について

箴島, 豊
九州大学農学部食品分析学教室

<https://doi.org/10.15017/21561>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 19 (1), pp.43-51, 1961-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：

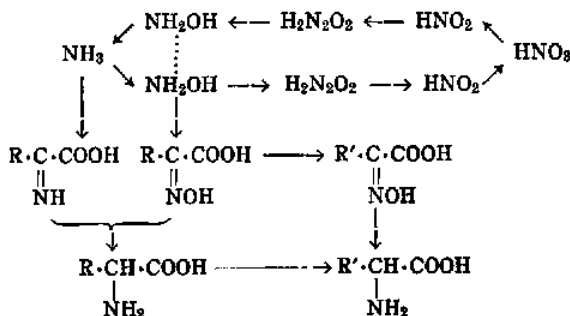
無機態窒素代謝サイクルでの次亜硝酸の生成 ならびに α -ケトグルタル酸オキシム の合成について

茂 島 豊

On the production of hyponitrite in the inorganic
nitrogen cycle and the method for the
synthesis of α -ketoglutarate oxime

Yutaka Osajima

最近我々は生体内における無機態窒素サイクルおよびアミノ酸生成経路として次のような模式を提出した。^{14,15)} 図中アンモニアから硝酸に至る無機態窒素の酸化経路については、その酵素性質の若干を検討しさらに生成物としてのヒドロキシルアミン、亜硝酸、硝酸の定量は勿論、反応液中からの次亜硝酸の検出にも成功した。^{14,16)} 一方硝酸からアンモニアに至る無機態窒素の還元経路については、この還元経路が動物体内にも存在することを明らかにするとともに、江上等¹⁾の耐塩菌からは見出されなかつた次亜硝酸還元酵素の存在を確めた。



次亜硝酸の還元については、Nicholas 等⁹⁾は最近 *Neurospora* 菌の磨碎遠沈上清が DPNH の存在下で次亜硝酸をアンモニアに還元することを見出しているし、Frear 等⁴⁾は大豆緑葉からの酵素が N^{15} -次亜硝酸をアンモニアに還元することを見出している。しかしながらこれらはいずれも次亜硝酸還元酵素の存在を指示するものではあるが、硝酸還元経路で亜硝酸からヒドロキシルアミンへの4電子反応の中間体として次亜硝酸が生成すると云う直接的証明ではなかつた。

我々は前報¹⁰⁾で記したように次亜硝酸の不安定性のために、正常反応系中からこれを証明することは出来なかつたが、今回酸化反応系中での次亜硝酸の検出にもちいた手法、す

なわち特異的阻害剤を利用して反応系中に次亜硝酸の蓄積を計り、検出証明することに成功したので報告する。

次に模式の下の部分—オキシムの代謝に関する実験にはヒドロキシルアミンの混入しないオキシムを多量に必要とするが、従来の α -ケトグルタル酸オキシムの合成法はこの目的からは余り好ましくなかつた。我々は種々検討した結果、ヒドロキシルアミンを含まないオキシムを高収率で得る方法を案出したのでここに併せ報告する。

I 無機態窒素還元系での中間体一次亜硝酸の検出

実 験

酵素の調製 1) 雄若鶏の新鮮な肝臓(固く鮮明な色をしている) 30gを M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 中に磨碎懸濁し、時々攪拌しながら 35°C で 30 分間抽出後 6000 r.p.m. にて 10 分間遠心分離する。上清を寒剤で冷却しながら冷却アセトン (-10~-15°C) を加え、33~55% のアセトン濃度で沈澱する部分を集め、57% の冷却アセトンにて洗滌して約 5 g の酵素標品を得た。これを氷冷水 20 ml に溶解し、3 時間流水透析後不溶部分を遠沈により除き “acetone-B enzyme soln.” として使用した。この酵素液中の蛋白態窒素量は銅-Folin 法によると 1 ml 当り 1~1.5 mg であつた。

2) 上のようにして得たアセトン濃度 33~55% で沈澱する部分 5g を氷冷水 20 ml に溶解し、磷酸カルシウムゲルの一種である Hydroxylapatite 15 g (湿潤状態) と混合して酵素蛋白を吸着させ、遠心分離により上清を捨て去り、水洗後 pH 7.5 の醋酸ソーダ 10^{-2} ~ 10^{-1} M で溶出する部分 20 ml をとり、3 時間流水透析後 “acetone-B-gel-enzyme soln.” として使用した。本酵素液中の蛋白態窒素量は銅-Folin 法によると 1 ml 当り 0.05~0.08mg であつた。このゲル吸着—溶出の操作により活性は “acetone-B enzyme” の約 30 倍に増大した。

Hydroxylapatite の調製 Tiselius 等¹²⁾ の方法を次のように改変して調製した。第二磷酸ソーダ (12 水塩) 540 g, 塩化カルシウム (2 水塩、純度 70~78%) 280 g を蒸留水に溶解し各 2 l とする。両溶液を分液ロートから等速 (150~200 滴/毎分) で落とし、受器を攪拌しながら磷酸カルシウムの沈澱を生成させる。静置後、サイホンにより上澄を捨て去り蒸留水にて 4 回洗滌する。蒸留水を加えて 4 l とし、新しく調製した 40% 苛性ソーダ液 100 ml を加え攪拌しながら 1 時間煮沸する (95°C 以上)。静置、上澄捨去後、蒸留水にて 4 回洗滌する。洗滌終了後 0.01 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) を加えて 4 l とし、攪拌しながら 85°C に達する迄加熱する (この段階では 85°C 以上は避けること)。上澄捨去後、再び同量の 0.01 M 緩衝液 (pH 6.8) を加え今度は 5 分間煮沸する (95°C 以上)。上澄捨去後、ついで 0.001 M 緩衝液 (pH 6.8) を加えて 15 分間煮沸する。今一度同…緩衝液を加えて 15 分間煮沸する。このようにして得られた Hydroxylapatite は 0.001 M 磷酸緩衝液 (pH 6.8) 中にて低温に保存される。このゲルは調製後約 1 カ月を経て使用されるのが好ましい。

DPN の調製 Le Page⁷⁾ の方法を次の如く改良して調製した。蒸留水 1.8 l を容量約

5 l の容器に入れ加熱する。沸騰しはじめたらバーナ 2 本を全開にし、激しく攪拌しながら細断したパン酵母を加える。液温は 90~92°C を保ち 80°C 以下にならぬよう留意する（この操作は収量を支配する）。酵母 5 ポンドを入れ終つたら加熱を止め、流水にてすみやかに冷却する。液温が 40°C 以下となつたら、濾過助剤としてスーパーセル 400~500 g を加え大型ブフナーで吸引濾過する。濾液（約 2 l）を濃苛性ソーダ液にて中和し（pH 7.7~7.2）、これに塩基性醋酸鉛 75 g を 200 ml の蒸留水に磨碎懸濁した液を攪拌しながら加え 1 夜氷室に放置する（この除蛋白操作は純度を支配する）。大型ブフナーに濾紙 2 枚をあてて濾過し透明な濾液を得る（最初は濁っているが次第に透明となつて来る）。濾液（約 2 l）を醋酸にて pH 6.5 とし、25% 硝酸銀 25 ml を攪拌しながら加え 1 夜氷室に放置する。サイホンにて上澄を捨去し残りを遠心分離（2500 r.p.m. 10 分）によつて除き、沈澱を蒸留水で洗滌する。蒸留水 20 ml を加え遠沈チューブ（ガラス製）に入れたままで硫化水素を通す。白色の沈澱が完全に消失した後、更に約 5 分間ガスを通し完全に脱銀する。遠心分離（2500 r.p.m. 5~7 分）により硫化銀の沈澱を除き 10 ml の蒸留水で洗う。上清に洗液を合わせて濾過し空気を送つて硫化水素を除く。稀苛性ソーダにて pH 7 附近に調整した後、冷却アセトンを加えて約 1 l とする。1 夜放置後、上澄液を捨去し新に冷却アセトンを加えて遠心分離し沈澱を集める。2~3 回精製アセトンにて洗い、真空デシケーター中で乾燥すると白色粉末状、純度 30~50% の DPN 0.5~0.8 g を得る。

$\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_2$ Jones 等⁹⁾の方法により前報¹⁰⁾のようにして合成した。

FAD ワカモト製薬製（純度 90%）を使用した。

定 量 法

NO_3^- ：尿素を加えて亜硝酸態窒素を除去後、2,4-Xylenole を用いる方法（未発表）により比色定量した。

NO_2^- ：Griess 試薬により比色定量した。

NH_3OH ：ヨード酸化—Griess 試薬呈色法^{6,9)}および前報の 8-Hydroxyquinoline 法¹⁰⁾により比色定量した。

N_2O_2 ：次亜硝酸定量法¹⁰⁾により比色定量した。

NH_3 ：インドフェノール法¹³⁾により比色定量した。

結 果 お よ び 考 察

正常反応系での無機態窒素の還元 無機態窒素還元反応での反応生成物については既に報告¹⁰⁾しているが説明の都合上略述する。

Table 1 は鶏肝臓からの酵素製品による無機態窒素還元反応での反応生成物を示したものである。除蛋白は 5 分間煮沸後氷醋酸 0.1 ml を添加して行なつたが、次亜硝酸定量用には前報¹⁰⁾に記載したように反応液に 2 倍量のメチルアルコールを添加して除蛋白した。基質として硝酸、亜硝酸、次亜硝酸、ヒドロキシルアミンなどの無機態窒素を与え、水素供与体として DPNH を加えるとこれら基質の還元はすみやかに起り、60 分間で添加基質の 40~60% が消失し、消失した基質窒素の大部分は最終生成物たるアンモニヤ態窒素として検出された。硝酸を基質とした場合は中間生成物として亜硝酸、ヒドロキシルアミンが検

Table 1. Enzymatic reduction of inorganic nitrogen using fowl liver enzyme.

Substrate	Disappeared (N _γ)	Reaction products formed (N _γ)		
		NO ₂	NH ₂ OH	NH ₃
NO ₃	63.0	1.05	4.2	48.0
NO ₂	52.5		4.8	31.5
N ₂ O ₂	94.5		4.8	15.0
NH ₂ OH	94.2			39.0

Reaction mixture : acetone-B enzyme soln. (N in 1.0 ml=1.45 mg) 2.0 ml, 10⁻²M substrate 1.0 ml, 0.01% FAD 1.5 ml, DPNH soln. (contained 5 mg of DPN, 1.0 ml of Et-OH, 0.1 ml of alcohol dehydrogenase soln.) 5.0 ml, total 15 ml. Reaction time, 60 minutes. Temperature, 33°C.

出され、亜硝酸を基質としたときはヒドロキシルアミンが検出されたが次亜硝酸は検出されなかつた。次亜硝酸、ヒドロキシルアミンを基質とした場合はその消失量に比し還元生成物の割合がかなり低くなっているが、これは両基質の反応液中での不安定性に起因するものと思われる。

無機態窒素還元系におよぼす一般的阻害剤の影響 実験にあつてはまず酵素液、緩衝液、阻害剤の三者を混合し 33°C の反応温度に 20 分間放置後基質を加え、さらに 10 分間置いてから DPNH を加え反応を始めた。活性の測定は 33°C、30 分間の反応によつて生じた 340 mμ の吸収の減少によつて行ない、各基質に対する阻害剤の阻害率を計算した。

Table 2. Effect of inhibitors on the inorganic nitrogen reductases.

Inhibitor	Concentration	Substrate			
		NH ₂ OH	N ₂ O ₂	NO ₂	NO ₃
KCN	2.5×10 ⁻³ M	69%	57%	0%	69%
CH ₂ COOH	"	89	68	68	93
Thiourea	"	0	100	89	90
Azide	"	68	56	91	66
EDTA	"	0	44	87	58
Uric acid	2.5×10 ⁻⁴	23	100	76	86
8-Hydroxy quinoline	"	0	50	36	87
PCMB	1.0×10 ⁻⁴	100	0	100	100

Reaction mixture : acetone-B-gel enzyme soln. (N in 1.0 ml=0.06 mg) 1.0 ml, inhibitor soln. 1.0 ml, M/5 phosphate buffer (pH 7.5) 0.5 ml, 5×10⁻³M substrate 0.5 ml, 0.01% FAD 0.5 ml, 0.05% DPNH* 1.0 ml, total 4.5 ml.

Reaction time, 30 minutes. Temperature, 33°C.

* DPN was reduced chemically with sodium hydrosulfite.

Table 2 に示すようにヒドロキシルアミンの還元はチオ尿素、EDTA (2.5×10⁻³M)、8-ヒドロキシキノリン (2.5×10⁻⁴M) ではまったく阻害されなかつたが尿酸 (2.5×10⁻⁴M) では 30% 弱、KCN (2.5×10⁻³M) では 70%、PCMB (1×10⁻⁴M) では 100% 阻害された。次亜硝酸の還元は PCMB (1×10⁻⁴M) ではまったく阻害されなかつたが EDTA (2.5×10⁻³M)、8-ヒドロキシキノリン (2.5×10⁻⁴M) では 50%、KCN (2.5×10⁻³M) では 60%、チオ尿素(2.5×10⁻³M)、尿酸 (2.5×10⁻⁴M) では 100% 阻害された。亜硝酸の還元は、KCN (2.5×10⁻³M) では少しも阻害されなかつたが 8-ヒドロキシキノリン (2.5×10⁻⁴M) で 40%、チオ尿素、EDTA (2.5×10⁻³M)、PCMB (1×10⁻⁴M) ではほ

とんど完全に阻害された。一方硝酸の還元は EDTA ($2.5 \times 10^{-3} M$) で 60%, KCN ($2.5 \times 10^{-3} M$) で 70%, チオ尿素 ($2.5 \times 10^{-3} M$), 尿酸, 8-ヒドロキシキノリン ($2.5 \times 10^{-4} M$), PCMB ($1 \times 10^{-4} M$) ではほぼ完全に阻害された。

次亜硝酸の安定性について 実際の酵素反応系から次亜硝酸の検出を企てる場合、前報¹⁰⁾の考察にしたがい、加熱による次亜硝酸の分解を避ける目的で除蛋白は反応液に2倍量のメチルアルコールを添加して行なつて来た。この点を今少し簡単にするために一般的蛋白沈澱剤として使用されている塩基性醋酸鉛、燐タングステン酸、トリクロル醋酸、醋酸ウラニウム、リバノール等に対する次亜硝酸の安定性および本酵素蛋白の沈澱性等検討した結果、醋酸ウラニウムが沈澱性、安定性ともに非常に優れていることを見出した。

Table 3 に示したように、次亜硝酸は5分間の煮沸をしないで氷醋酸を加えて強酸性化することによつて完全に分解消失した。この際 Griess 試薬呈色物を残さないのも煮沸の場合と同じであつた。除蛋白剤である醋酸ウラニウムや過剰の添加は次亜硝酸に何ら分解作用をおよぼさず、検液微酸性下をもたらす関係上むしろ次亜硝酸を安定化した。醋酸ウラニウム添加による安定化の程度は燐酸緩衝液よりもトリス緩衝液の方が少しばかり大きくなつたが、これは中性付近での両者の緩衝能の差に起因するものと思われる。亜硝酸はこれらの操作によつて何ら影響を受なかつた。亜硝酸と次亜硝酸の比色値(-Log T)の間に算術的關係の成り立つことは前報のとおりであつた。

Table 3. Effect of uranium acetate and acetic acid on the stability of hyponitrite.

Buffer	NO ₂	Boiled ¹⁾	HAc, U-Ac ²⁾	U-Ac ³⁾	HAc ⁴⁾	None ⁵⁾
Phosphate buffer	+	0.136	0.130	0.230	0.140	0.189
	-	0.000	0.003	0.090	0.005	0.058
Tris buffer	+	0.140	0.136	0.251	0.143	0.205
	-	0.002	0.000	0.105	0.000	0.070

Reaction mixture: $10^{-3} M$ N₂O₂ 1.0 ml, M/5 buffer (pH 7.5) 0.5 ml, $10^{-3} M$ NO₂ or H₂O 1.0 ml, total 10 ml.

Reaction time, 30 minutes. Temperature, 33 °C.

After incubation, the mixture were treated as stated in 1) to 5) and 1.0 ml of each was diluted to 10 ml with water and determined.*

1): added 1.2 ml of water and boiled for 5 minutes.

2): added 0.2 ml of glacial acetic acid and 1.0 ml of saturated uranium acetate.

3): added 1.0 ml of saturated uranium acetate and 0.2 ml of water.

4): added 0.2 ml of glacial acetic acid and 1.0 ml of water.

5): added 1.2 ml of water.

* In the case that precipitate was produced, it was removed through centrifugation.

これらの結果を利用すると酵素反応液中で亜硝酸、ヒドロキシルアミンと混在している次亜硝酸の分別定量は前報の方法¹⁰⁾よりも正確かつ容易となつて来る。すなわち、反応終了後、醋酸ウラニウムと氷醋酸の両方を使つて除蛋白した上清と、醋酸ウラニウムだけを加えて除蛋白した上清の両者を次亜硝酸定量法により比色しその比色値の差(-Log T)をとれば次亜硝酸の比色値となる。

亜硝酸還元反応生成物一次亜硝酸の生成 次亜硝酸は我々の酵素標品により還元を受けてアンモニヤを生成するので (Table 1) 一応亜硝酸からヒドロキシルアミンに至る中間

体と推定して間違いはないが、実際に反応系から検出しないかぎり中間体と断ずることは出来ない。ところが次亜硝酸は極めて不安定であり、たとえ反応系中に生成したとしても Table 1 のように逐次還元反応を許すのではその検出は不可能に近いものと思われる。

Table 4. Accumulation of hyponitrite.

System	NO ₂ -nitrogen disappeared	N ₂ O ₂ -nitrogen formed
Complete	63 μ	29 μ
Boiled enzyme	8	0
Without NO ₂	0	0

Reaction mixture: acetone-B enzyme soln. (N in 1.0 ml=1.5 mg) 10 ml, 10⁻²M NO₂ 1.0 ml, M/5 phosphate buffer (pH 7.5) 2.0 ml, 0.01 % FAD 3.0 ml, DPNH soln. (contained 10 mg of DPN, 1.5 ml of Et-OH, 0.2 ml of alcohol dehydrogenase soln.) 5.0 ml, 2 \times 10⁻²M KCN 5.0 ml, total 30 ml.

Reaction time, 30 minutes. Temperature, 33°C
Deproteinization for NO₂ test; added 2.0 ml of saturated uranium acetate and 0.2 ml of glacial acetic acid for 10 ml of the reaction mixture.

Deproteinization for N₂O₂ test; added 2.0 ml of saturated uranium acetate and 0.2 ml of water for 10 ml of the reaction mixture.

Table 4 の結果をみると、亜硝酸態窒素の消失量 (63 μ) に対して生成した次亜硝酸態窒素量 (29 μ) は約半分になっている。これは Table 2 で示したように KCN が次亜硝酸還元系を 60 % しか阻害しないこと、さらに反応液中での次亜硝酸の分解消失などによつて説明されるであろう。

このようにして我々は亜硝酸還元反応生成物としての次亜硝酸を検出、定量することに成功した。この成功は亜硝酸(窒素の酸化度+3)からヒドロキシルアミン(窒素の酸化度-1)に至る間の酸化度+1の窒素化合物に対する多くの実験的試みに決定的な結論をあたえるものであろう。

II α -Ketoglutarate oxime の合成

合成法としてはまず Quaster 等¹¹⁾のケト酸オキシム合成法が知られている。この方法はヒドロキシルアミン塩酸塩と遊離酸を混合し、これに重炭酸ソーダを少しずつ加えて中和しながらオキシムを生成させるものである。実際に合成してみると、ピルビン酸オキシムのように結晶し易い場合は良好なる結果を得たが、 α -ケトグルタル酸オキシムのように食塩、炭酸ソーダよりも結晶し難い場合、オキシムの単離法を確立しなければその結晶化は無理であつた。我々の研究室では江藤等²⁾により反応液をコンゴレッド酸性にし、エーテル抽出する方法が試みられ、かなりの収率をあげるに至つているが、オキシムを多量に必要とする我々の目的からは未だ不完全な方法であつた。今一つの合成法として Fenton 等⁹⁾のアルコール溶液中で遊離アミンと反応させる方法がある。この方法では反応液を糊化して結晶化するため高純度、高収率は期待出来なかつた(我々の実験では2度再結して

方、我々は先に酸化反応系中よりの次亜硝酸の検出に際し、8-ヒドロオキシキノリン、PCMB等の次亜硝酸の酸化に対する特異的阻害剤をもちいてその検出に成功している¹⁶⁾、この方法を還元反応系中からの次亜硝酸の検出にも利用することを考えた。Table 2 をみるに、KCNはその濃度 2.5 \times 10⁻³Mでは亜硝酸の還元を少しも阻害しないが次亜硝酸の還元は60%阻害している。そこで亜硝酸を基質とし、この特異的阻害剤-KCNを加えて亜硝酸還元系によつて生じた次亜硝酸のヒドロキシルアミンへの還元を抑制し、反応液中に次亜硝酸の蓄積を計りその検出を試みた。

Table 4 の結果をみると、亜硝酸態

収率 10% であつた)。

我々は種々検討しているうちにオキシムのソーダ塩はアルコール難溶であることを見出し、次のように生成したオキシムをモノソーダ塩とすることによつてより容易に合成、再結出来るようになった。

合成法 ヒドロキシルアミン塩酸塩 (純度 95%) 0.73 g (0.01 mol.) を無水アルコール 20 ml に加温溶解し、これに 0.24 g の金属ナトリウムと無水アルコール 20 ml とから作つたナトリウムエチラートを徐々に加え中和する。中和にあつてはフェノールフタレイン 1 滴を加え、赤変しないように注意する。生じた塩を濾別し、無水アルコール 20 ml にて洗う。こうして作つたヒドロキシルアミン溶液を、1 g の α -ケトグルタル酸 (0.00685 mol.) を 20 ml の無水アルコールに溶解した液に、徐々に加え約 2 時間以上放置する。ウォーターバス上にて結晶の析出するまで減圧濃縮し、新たに無水アルコール 60~80 ml を加えて加温溶解する。これに 0.16 g の金属ナトリウムに相当する量のナトリウムエチラートを加え、生じた白色大量沈澱を吸引濾過によつて集める。沈澱を 10~15 ml の熱水に溶解し、約 100 ml の無水アルコールを加え白色沈澱が上澄と分れ結晶状となるまで (必要とあらばアルコールを加え足して) 減圧脱水する。同様の操作によりアルコールから 2 度再結して、 α -ケトグルタル酸オキシム 0.8 g を得た (収率 60% 強)。本結晶は遊離ヒドロキシルアミンを少しも含まない美麗なる結晶にして、水溶液は中性または微酸性であつた。

総 括

1) 鶏肝臓から調製した無機態窒素還元酵素群に対する阻害剤の影響を調べ、次のような結果をえた。ヒドロキシルアミンの還元はチオ尿素、EDTA ($2.5 \times 10^{-3} M$)、8-ヒドロオキシキノリン ($2.5 \times 10^{-4} M$) では少しも阻害されなかつたが、尿酸 ($2.5 \times 10^{-4} M$) では 30% 弱、KCN ($2.5 \times 10^{-3} M$) では 70%、PCMB ($1 \times 10^{-4} M$) では 100% 阻害された。次亜硝酸の還元は PCMB ($1 \times 10^{-4} M$) でまったく阻害されなかつたが、EDTA ($2.5 \times 10^{-3} M$)、8-ヒドロオキシキノリン ($2.5 \times 10^{-4} M$) で 50%、KCN ($2.5 \times 10^{-3} M$) では 60%、チオ尿素 ($2.5 \times 10^{-3} M$)、尿酸 ($2.5 \times 10^{-4} M$) では 100% 阻害された。亜硝酸の還元は KCN ($2.5 \times 10^{-3} M$) ではまったく阻害されなかつたが、8-ヒドロオキシキノリン ($2.5 \times 10^{-4} M$) で 40%、チオ尿素、EDTA ($2.5 \times 10^{-3} M$)、PCMB ($1 \times 10^{-4} M$) などではほとんど完全に阻害された。一方、硝酸の還元は EDTA ($2.5 \times 10^{-3} M$) で 60%、KCN ($2.5 \times 10^{-3} M$) では 70%、チオ尿素 ($2.5 \times 10^{-3} M$)、尿酸 ($2.5 \times 10^{-4} M$)、8-ヒドロオキシキノリン ($2.5 \times 10^{-4} M$)、PCMB ($1 \times 10^{-4} M$) などではほぼ完全に阻害された。

2) 次亜硝酸の安定性について次のような新しい知見を得た。次亜硝酸は一般的な蛋白沈澱剤である醋酸ウラニウムによつては分解作用を受けず、むしろ安定化せられた。一方、氷醋酸を加えて強酸性化すると完全に分解され、その際 Griess 試薬呈色物を残さなかつた。

3) 無機態窒素の逐次還元反応系から中間体としての次亜硝酸の検出に成功した。亜硝酸還元系に KCN を加えて、生成した次亜硝酸のヒドロキシルアミンへの還元を抑制して

反応液中に次亜硝酸の蓄積を起させ、これを比色定量した。

4) α -ケトグルタル酸オキシムの合成法について記した。

終りに臨み、終始御指導御鞭撻を頂きました山藤先生、大村先生に深謝するとともに、実験に御協力下さいました原口、安永両氏に謝意を表します。

文 献

- 1) 江上, 1957. 化学と工業, **1**: 234.
- 2) 江藤, 山藤, 1954. 九大農製特報, (12): 8.
- 3) Fenton, H. J. H. and Jones, H. O., 1901. J. Chem. Soc., **79**: 94.
- 4) Frear, D. S. and Burrell, R. C., 1958. Plant Phys., **33**: 105.
- 5) Jones, L. W. and Scott, A. W., 1924. J. Am. Chem. Soc., **46**: 2172.
- 6) 近藤, 秋田, 1950. 農化, **23**: 373.
- 7) Le Page, G. A., 1947. J. Biol. Chem., **168**: 623.
- 8) Medina, A. and Nicholas, D. J. D., 1957. Nature, **179**: 533.
- 9) 大村, 1952. 九大農芸誌, **12**: 372.
- 10) 飯島, 1961. 九大農芸誌, **18**: 271.
- 11) Quastel, S. H., Scholefield, P. G. and Stevenson, J. W., 1952. Biochem. J., **51**: 278.
- 12) Tiselius, A., Hjerten, H. and Levin, O., 1956. Arch. Biochem. and Biophys., **65**: 132.
- 13) 八木, 奥田, 1959. 蛋白質・核酸・酵素, **4**(2): 137.
- 14) Yamafuji, K., Osajima, Y., Omura, H. and Hatano, S., 1960. Enzymol., **21**: 245.
- 15) Yamafuji, K., Osajima, Y. and Omura, H., 1960. Nature, **185**: 162.
- 16) Yamafuji, K. and Osajima, Y., Enzymol., (in press).

Summary

1) Effect of inhibitors on the inorganic nitrogen reductases from fowl liver were studied. The rate of inhibition of the reductases by several reagents was as follows.

Hydroxylamine :

Thiourea, EDTA ($2.5 \times 10^{-3}M$), 8-Hydroxyquinoline ($2.5 \times 10^{-4}M$)	0 %
Uric acid ($2.5 \times 10^{-4}M$)	30 %
KCN ($2.5 \times 10^{-3}M$)	70 %
PCMB ($1.0 \times 10^{-4}M$)	100 %

Hyponitrite :

PCMB ($1.0 \times 10^{-4}M$)	0 %
EDTA ($2.5 \times 10^{-3}M$), 8-Hydroxyquinoline ($2.5 \times 10^{-4}M$)	50 %
KCN ($2.5 \times 10^{-3}M$)	60 %
Thiourea ($2.5 \times 10^{-3}M$), Uric acid ($2.5 \times 10^{-4}M$)	100 %

Nitrite :

KCN ($2.5 \times 10^{-3}M$)	0 %
8-Hydroxyquinoline ($2.5 \times 10^{-4}M$)	40 %
Thiourea, EDTA ($2.5 \times 10^{-3}M$), PCMB ($1.0 \times 10^{-4}M$)	100 %

Nitrate :

EDTA, KCN ($2.5 \times 10^{-3}M$)	...	60 ~ 70 %
Thiourea ($2.5 \times 10^{-3}M$), Uric acid, 8-Hydroxyquinoline ($2.5 \times 10^{-4}M$), PCMB($1.0 \times 10^{-4}M$)	...	85 ~ 100 %

2) Hyponitrite was decomposed completely by the addition of glacial acetic acid without producing any nitrite as well as by heating at 100° C. On the other hand, there was no decomposition of hyponitrite by uranium acetate which was used for the deproteinization.

3) Hyponitrite was determined as the reducing product of nitrite. Although hyponitrite was not detected in the normal reduction of nitrite, it can be estimated when KCN, a specific inhibitor for its reduction, was added to the reaction mixture.

4) The improved method for the synthesis of α -ketoglutarate oxime was described.