

?肝臓の硝酸還元酵素(1)

大村, 浩久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21432>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 16 (2), pp.225-237, 1957-11. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



雞肝臓の硝酸還元酵素 (I)

大 村 浩 久

On the nitrate reductase of the fowl liver (I)

Hirohisa Omura

緒 言

先に廿日鼠及び牛の肝臓酵素に就て若干の報告を行つたが(1954-b), 又家蚕組織に硝酸還元作用を阻害する因子が含まれる事を認め其の本態が尿酸である事を確めた(1957). 更に Xanthine, Hypoxanthine, Guanine, Adenine 等生体内に於ける尿酸の先駆物質も同様に阻害作用を示す事を観察した(未発表). 一方動物組織による硝酸塩の還元は Xanthine 酸化酵素の作用であつて, 硝酸塩が酸素に代つて反応する事により行われると古くから主張されているが(Dixon and Thurlow, 1924), 近年特に著しく進展した Metalloflavoprotein に関する研究から Xanthine 酸化酵素 (Kielley, 1955; Remy et al., 1955; Richert and Westerfeld, 1954; Wac Klear et al., 1954), も *Neurospora* の硝酸還元酵素 (Nicholas et al., 1953; Nicholas and Nason, 1954) も共に Mo を活性基とする Flavin 酵素である事が判明した. 最近 Westerfeld 等 (1956) は種々の Mo-Flavoprotein 中, 牛乳や哺乳動物並びに鳥類肝臓の Xanthine 酵素の外に Aldehyde oxidase, 硝酸還元酵素, Hydrogenase 等では硝酸塩が酸素, Methylene blue 或は Indophenol と共に水素受容体として作用し得ると記載している.

何れにしても硝酸塩の還元は Purine 代謝と密接な関連を持つ事が推定される. 尿酸は哺乳動物に於ては Uricase により更に分解され尿素として排泄されるがそれと共に硝酸還元阻害能も消失する. 併し雞肝は Uricase を含まない為そのまま排泄される. 然も硝酸還元能を示すので哺乳動物の酵素と比較研究する事が好都合だと思われ, その一部は既に報告した(1957). 雞肝臓の硝酸還元能に関しては Bernheim, Dixon (1928) の簡単な記載があり前記 Westerfeld 等も Xanthine dehydrogenase 作用として多少触れているに過ぎない. 従つて今後の研究を進めるに当りその一般的性質について一応の概念を得る必要があると考える.

実 験

作用力の測定は特記する場合の外前報 (1954-b) に従つて行い, 活性は生成した NO_2 の濃度を以て示した.

1. 抽出効果 牛肝臓の場合, 水或は緩衝液での磨碎懸濁液及び之を遠心分離して得られた濁濁上層部に活性があることを観察し, 其の後之を出発物として酵素標品を調製した. 雞肝についても先ずこれに依つて抽出試験を試みた. 十分に水洗した新鮮組織を少量

の硅砂及び pH 6.0 の M/15 磷酸緩衝液と共に乳鉢でよく磨砕し調製した 10% (M/V) homogenate を前回同様“原酵素液”とし、之を 3000 r. p. m. で 10 分間遠心分離、上層部を旧量に復して“抽出酵素液”とした。又沈澱部も再び同じ緩衝液に磨砕懸濁し同量の“残渣酵素液-I”を得た。以下同様の処理を行い“残渣酵素液-II”とする。之等酵素液一定量は含有する絶対量は勿論異なるが何れも同一量の前組織に対応する。即ち試験には酵素液 5 ml 宛を用いたが何れも原肝臓組織 0.5 g に相当する。その一例を第 1 表に示す。沸騰水に 5 分間浸漬した酵素での育験区には勿論 NO₂ の生成は認められなかつた。

Table 1. Extraction of liver tissues with buffer.

| Enzyme used | Original-enzyme | Extract-enzyme | Residue-enzyme I | Residue-enzyme II |
|------------------------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| NO ₂ formed, in μ M | 82.0 | 100.0 | 34.0 | 22.0 |
| Ratio | 100.0 | 120.7 | 41.5 | 26.8 |

緩衝液の代りに水を用いても殆ど同様の傾向を示し組織懸濁液そのものよりも結縮組織、組織片、細胞片等粗大部を除いた抽出部の方が NO₂ 量は若干多い様であつた。此の点牛の場合と異なる。此の一因として生成された NO₂ が更に酵素的分解を受ける事も考えられる。通常 NO₂ 還元酵素測定に用いた条件で生成濃度即ち約 50~100 μ M の NO₂ を NO₃ の代りに用いて反応させると、場合により NO₂ が減少する事があつたがその減少度はせいぜい 10% 以下であつた。併し試料によつてかなり変動し時には著しい減少を来しその極端な場合は 20% に及ぶ事もあつた。然も明かに“原酵素液”に於て“抽出酵素液”に於けるよりも NO₂ 減少度は常に大きかつたが、此の両者の差は顕著ではなく何れの場合も 5% 程度を越える事はなかつた。従つて“抽出酵素液”による NO₂ の還元量が“原酵素液”によるものよりも常に大きい事は時に起る NO₂ の引続き減少する度合の少い事だけに帰する事は出来ない。寧ろ NO₂ 測定の為に行う液の清澄化に際し沈澱部への吸着の差等も考えられる。又“残渣酵素液”の活性も多少変動し一部は破壊を免れた組織片や細胞等の残存活性に基く事も示唆されるが、少くも同様の操作により牛肝臓では常に活性が見られず此の点にも牛肝の場合との相異が認められる。

NO₂ の還元は第 1 図に示す様に酵素量 0.5 g 迄はほぼ直線関係にある事が観察された。酵素量が更に多くなると反応液が稠密になり操作にもいろいろの不都合を来すが特に液の清澄に際し沈澱蛋白への NO₂ の吸着が非常に多くなる虞れも生ずる。10% homogenate 或はその遠沈上層液では 3~5 ml 即ち原肝臓組織 0.3~0.5 g が最も操作し易い事は従来屢々経験し牛及び廿日鼠では専ら此の量を用いて来たが雞の場合も同様であつた。

酵素作用が反応時間にも比例する事は第 2 図から明らかであるが、NO₂ の比色測定精度に鑑みて常法通り 2 時間を用いた。

NO₂ 濃度の影響は第 2 表に示す。濃度が高い程還元生成物の量は増大するが還元率は低下する。併し同様に Griess 試薬による発色度より $2 \sim 1 \times 10^{-2}$ M を用いて十分な事は従来通りであつた。

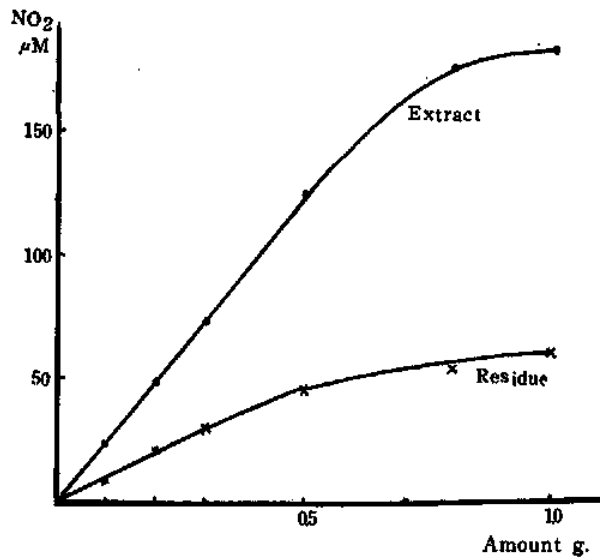


Fig. 1: Enzyme-activity curve.

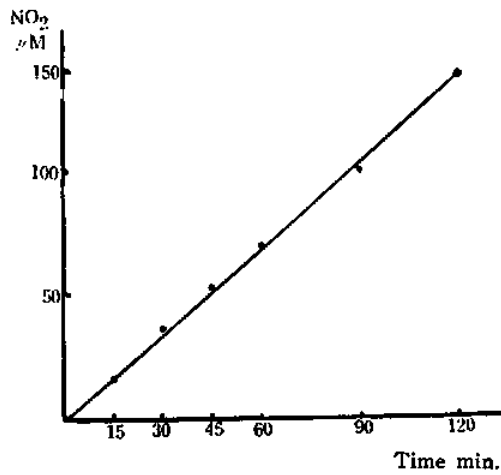


Fig. 2: Reaction time-activity curve.

Table 2. Effect of concentration of NO₃.

| Final Conc. of NO ₃ , in M | 0.1 | 0.05 | 0.01 | 0.005 | 0.001 |
|---------------------------------------|------|------|------|-------|-------|
| NO ₂ formed, in μM | 35.0 | 22.4 | 13.4 | 11.5 | 4.1 |

2. 加熱の影響 酵素液 5 ml (肝臓 0.5 g に相当) を夫々の温度に一定時間浸漬した後残存する活性を比較した (第 3 表).

Table 3. Effect of heating at various temperatures on NO_2 reductase.

| Enzyme used | Time, in min. | Temperature, in $^{\circ}\text{C}$ | None | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|------------------|---------------|--|-------|-------|-------|------|----|----|
| "Extract-enzyme" | 5 | NO_2 formed, in μM | 8.4 | | 7.6 | 5.4 | 0 | 0 |
| | | Ratio | 100.0 | | 90.5 | 64.3 | 0 | 0 |
| "Residue-enzyme" | 10 | NO_2 formed, in μM | 4.8 | 5.5 | 4.8 | 3.3 | 0 | 0 |
| | | Ratio | 100.0 | 115.0 | 100.0 | 68.8 | 0 | 0 |

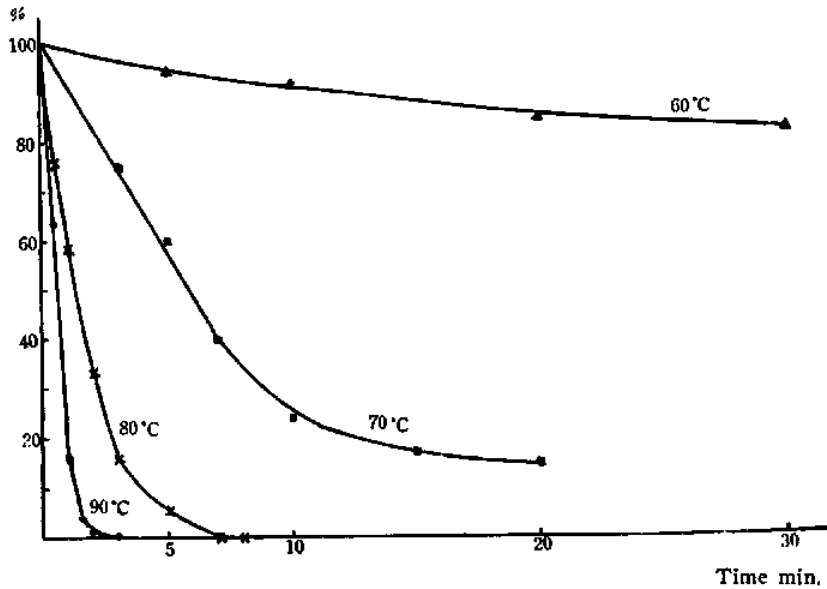


Fig. 3: Inactivation of enzyme by heating.

次いで同様に“抽出酵素液”を各温度に種々の時間浸漬して活性の低下を追及しその結果を第3図に示す。90°では2分、80°では5分で殆ど完全に不活性化されるが、70°では20分間熱しても尚15%の酵素力を保存し既に10分で略一定値に達している。又60°では30分間で約20%の活性減少を来した。何れの温度に於ても最初はほぼ直線的に活性を低下し爾後徐々に或る終値に近づく傾向を示す。而して変曲点の位置、それ迄の時間迄に最終値は温度が高い程速かて且つ低い事は容易に予想される所である。

3. 最適 PH “抽出酵素液”の pH-活性曲線を第4図に示す。此の場合組織 0.5 g に相当する 2 ml の酵素液を種々の pH の M/10 緩衝液 5 ml に添加して活性測定に用いた。雞肝酵素に於ても廿日鼠、牛の場合と同様に pH 5.8 附近に最適値があり且つ醋酸緩衝液の場合磷酸塩より高い活性値を示した。併し作用 pH 範囲は更に広く特に磷酸緩衝液では pH 6 乃至 7 の間にほぼ平坦な最適 pH 域を示したが中性点を越える事はなかつた。

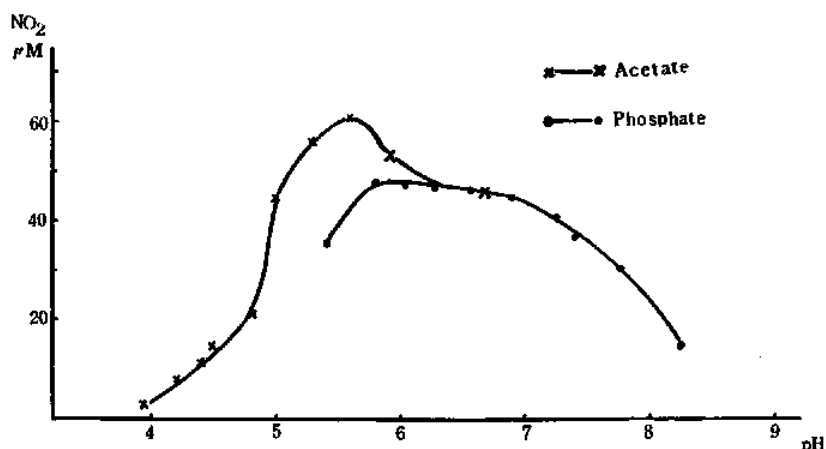


Fig. 4: pH-activity curve.

4. 水素供与体 NO_2 還元反応も他の生体内反応と同様に単独で起るものではなく多くの反応特に脱水素酵素系と密接に共働する事は既に家蚕 (1954-a), 廿日鼠蚊に牛肝 (1954-b) に就て報告したが雞肝臓の場合も例外ではあり得ないと推定される。従つて関連する諸酵素系及びその基質並に其の他の因子を含んだ粗酵素液を用いての研究が組織内反応の状況を追究するに無意味ではないと思われる。併し此の場合、組織自身に含まれる固有の基質が優先して反応する為、家蚕蚊に廿日鼠のように組織を磨碎抽出して大部分の基質を除いた為活性が著しく低出した“残渣酵素液”に種々の水素供与体を添加して酵素力の恢復を見るか、或は牛肝の様に“残渣酵素液”に活性を残さない場合“抽出酵素液”に著しく多量の物質を加えてその影響を検討し共働する水素供与系を推定した。併し雞肝臓では両酵素液に5倍及び3倍量の糖類或は種々の酸を加えたが従来の場合程明白な結果が頭れなかつた。此の事は之迄試験した各組織中雞肝の場合が最も優先して固有の水素供与体が作用して居て他の介入を許さないか或は試験した基質に対応する以外の特殊の酵素系のみが関与している事が想像される。従つて他の手段を用いる事が必要であつた。

そこで透析によつて之等固有の基質を除く事を企てた。新鮮組織 9g より常法によつて調製した“抽出酵素液” 90 ml の中 80 ml をセロファン膜を用いて一晚流水透析した後遠心分離して析出蛋白を除きほぼ透明な上澄液 90 ml を得た。又沈澱も水に懸濁 10 ml と

Table 4. Effect of dialysis on “Extract-enzyme”.

| Enzyme used | Original extract | Dialysed extract | | | | Precipitate | |
|--|------------------|------------------|-----------|----------------------|---------------|-------------|---------------|
| | | None | Dialysate | Liver boiled-extract | Acet-aldehyde | None | Acet-aldehyde |
| NO_2 formed,* in μM | 25.0 | 2.5 | 5.8 | 4.9 | 14.6 | 0.74 | 1.07 |

* Corrected to the values corresponding to 0.5 g of fresh liver tissues.

しその各 5 ml に就て酵素力を試験した。尚使用した酵素量が異なるので活性は原組織 0.5 g 相当量に補正した。第 4 表の結果から判る様に明かに透析により活性は著しく低下するが透析外液或は肝臓加熱抽出液により或る程度活性を恢復した。又沈澱蛋白には殆ど活性が認められなかつた。本試験に用いた透析外液は別に 90 ml の“抽出酵素液”を 2 l の蒸留水に対し氷室中で一晩透析し外液を 50° で減圧濃縮 16 ml とした。又肝臓加熱抽出液は雞肝臓 5 g を乳鉢中でよく磨碎し水を加えて 10 ml 懸濁液とする。之を沸騰水に 5 分間浸漬した後凝固蛋白を遠沈除去し黄色上澄を 10 ml として調製しその各 1 ml を添加した。従つて透析外液は 5 g 加熱抽出液は 1 g の新鮮肝臓に相当する訳であるが、之等が少くも一部の水素供与体を含む事は推定される。Acetaldehyde は M/5 溶液 1 ml を加えたがその顕著な賦活効果については後に述べる。

種々の有機酸による透析酵素液の活性復元効果を第 5 表に示す。此の場合 42 時間流水透析した“抽出酵素液”に M/10 溶液を 1 ml 宛添加した。林檎酸, Glutamin 酸, 及び琥珀酸が特に強い促進効果を示したが、更に其の他の酸も順序こそ異なるが水素供与体と

Table 5. Reactivation of dialysed NO_3 reductase by various substances.

| Added, | None | Malate | Gluta- mate | Succi- nate | Tarta- rate | Fuma- rate | Lac- tate | Malei- nate | Mal- o-nate | Cit- rate | AA* |
|---|-------|--------|----------------|----------------|----------------|---------------|--------------|----------------|----------------|--------------|-------|
| NO_2 formed, in μM | 6.6 | 15.1 | 14.8 | 13.6 | 12.0 | 10.9 | 9.7 | 9.3 | 8.8 | 8.5 | 22.1 |
| Ratio | 100.0 | 228.8 | 224.2 | 206.1 | 181.8 | 165.2 | 147.0 | 140.9 | 133.2 | 128.8 | 319.7 |

* AA : Acetaldehyde.

して有効な事は哺乳動物について観察された事と同様である。併し Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Xylose, Rhamnose, Arabinose 等の糖類或は牛肝で効力を認められた Glycine, Alanine, Asparagine, Ethanol 等何れも明白な影響を認める事は出来なかつた。

前報で示した様に牛肝に於ては特に Acetaldehyde の促進効果が顕著であるが廿日鼠と共に雞肝でも寧ろ阻害的に作用するか或は殆ど無関係であつた。此の場合も試料によつて個差があり促進的に作用する事もあつたがその際でも程度は極めて僅少であつた。併し透析液では第 4, 5 表に既に示した様に Acetaldehyde の効果が常に顕著に顕れる様になり原液の活性を遙かに超過する事もあつた。併し固有の水素供与体を含む“抽出酵素液”に対

Table 6. Mutual effect of dialysate and acetaldehyde on dialysed NO_3 reductase.

| Enzyme used | Original extract | | Dialysed extract | | | | | |
|---|------------------|-----|------------------|-----|-------|--------|--------|--------|
| | None | AA* | None | AA | FLD** | AA,FLD | CLD*** | AA,CLD |
| NO_2 formed, in μM | 9.6 | 9.6 | 4.3 | 6.5 | 8.7 | 8.7 | 7.0 | 7.2 |

* AA : Acetaldehyde. ** FLD : Fowl liver dialysate. *** CLD : Cattle liver dialysate.

しても6乃至8倍の賦活作用を示した牛の場合程は著しくなく最も強い時でも約3倍であつた。透析外液中に水素供与体が出て来る事は既に示したが、之が共存すると Aldehyde の効果が抑えられる様な傾向を示した（第6表）。

此の場合の酵素液は第4表記載に準じて調製したが“原抽出液”は15,000 r. p. m. で60分高速遠沈を行つて得た透明な上澄液を用い透析は21の蒸溜水に対し氷室中で一晩行つた。透析外液は雞肝並に牛肝共に前回同様に調製した濃縮液を用い試験にはその1mlを加えた。尚雞肝透析酵素に牛肝外液の有効な事も従来の経験から予想されたが事実結果は之を示した。

之等の事から肝臓内に含まれる物質によつてその代謝系は Acetaldehyde がむしろ多少とも水素受容体として作用し NO_2 と拮抗する状態になつていと推定される。併し之等低分子物質が除去されると種々の酵素系は変動し Aldehyde が逆に供与体としての役割を果す代謝系になると思われる。

何れにしても肝臓内に含有される低分子物質が特に優先して水素供与体として作用している事は容易に推定されるが事実“抽出酵素液”はかなり強い Methylene blue 脱色能を持つ。併し水素供与を仲介する酵素が NO_2 還元を触媒する酵素と同一のものとは謂い難く、使用した粗酵素液に於て強力な NO_2 還元力を示すものが必ずしも強い水素供与能を持つとは限らない事は屢々経験した。その一例を第7表に示すが酵素は何れも夫々異なる個体の新鮮肝臓 0.5g に相当する“抽出酵素液”であつて夫々 $2 \times 10^{-4} \text{MNO}_2$ 又は 10^{-3}M Methylene blue 1ml を用いた外は反応条件は悉て同一であつた。

Table 7. Methylene blue decoloration and NO_2 reduction of “Extract enzyme.”

| Exp. No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| NO_2 formed, in μM | 38.4 | 20.0 | 14.7 | 12.9 | 12.6 | 12.0 | 10.0 | 10.2 | 10.5 | 23.8 | 23.8 | 15.3 | 20.8 | 13.5 |
| Time of MB* decoloration, in min. | 5 | 55 | 68 | 79 | 82 | 80 | 90 | 120 | 9 | 49 | 60 | 59 | 35 | 35 |

* MB; Methylene blue.

広く概観すれば Methylene blue 脱色能と NO_2 還元力とは平行する様であつて（実験1~5）ほぼ同一の還元能を持つものは大体同じ時間に色素を脱色する（実験4~7）。併し実験9及び10の様に全くその逆を示すものもあり、 NO_2 生成量は同一でも Methylene blue 脱色時間は異なるもの（実験10及11）。或は逆に同一の脱色時間であるにも拘らず実験11と12、及び13と14に見られる様に NO_2 還元力の異なる事もある。又反応液中 10^{-4}M の色素が比較的短時間に完全に脱色される事から少くもそれ以上の水素が2時間では提供されている訳であるが還元される NO_2 の量は遙に少く、即ち仮令脱水素酵素力は他の酵素のものに比べて弱くても NO_2 還元酵素によつて利用される量は十分に多い事を示し、従つて“抽出酵素液”の場合水素供与量の多い条件で反応が行われていると思われる。

Xanthine 或は Aldehyde 酸化酵素が NO_2 を還元する事は既に述べた様に古くから主張された所であつて透析酵素に於ける Acetaldehyde 添加の著しい効果は此の事実を示唆する。生体内に於ては種々の水素伝達系があり従つて上記“抽出酵素液”に於て Me-

thylene blue の脱色に関与するものは Aldehyde を含む種々の Dehydrogenase 系であり此の中 NO_3 還元に与るものは Aldehyde dehydrogenase 其他二三の酵素だけであるとすれば、Methylene blue の脱色時間と NO_3 還元力が必ずしも平行しない事は矛盾せず、且つ短時間に多量の水素が提供されているにも拘らず NO_3 還元を用いられるものはその一部に過ぎない事実も了解される。而して酵素の精製に当り Aldehyde dehydrogenase 活性と NO_3 還元力とが常に相伴う事、然も単に硫酸沈澱を行つた程度の極く初期の精製段階でも Acetaldehyde を加えなければ NO_3 の還元は起らず“抽出酵素”で透析後有効な Glutamin 酸等は効果がない事等は此の事を裏付ける根拠となつてゐる。併し透析した“抽出酵素液”は既に述べた様に活性を低下するが之と共に Methylene blue の脱色能も著しく減退し 2 時間でも殆ど色調の衰退を来さないが、Acetaldehyde の添加によつて NO_3 還元力の増加と共に Methylene blue 脱色能も恢復し明かに此の場合 Aldehyde dehydrogenase の活動によつて両作用が行われている事を示唆する。併し此の場合も両作用力が必ずしも平行しない事は第 8 表に示す通りである。試験は勿論別個の組織より調製した酵素液を用いた他は測定条件等総て同一にした。

Table 8. Relation between aldehyde dehydrogenase activity and NO_3 reduction of "Dialysed extract."

| Exp. No., | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--|------|------|------|-----|-----|
| NO_3 formed, in μM | 24.6 | 20.5 | 19.0 | 7.2 | 6.8 |
| Time of MB* decoloration, in min. | 25 | 65 | 10 | 51 | 24 |

* MB : Methylene blue

又一晩流水透析後更に蒸溜水に対し一日透析した“抽出酵素液”各 10 ml に種々の量の活性炭を加えよく振盪して吸着させた後遠心分離した上澄液の NO_3 還元と Methylene blue 脱色との関係を第 9 表に示す。

Table 9. Effect of charcoal treatment on NO_3 reduction and MB decoloration of "Dialysed extract."

| Charcoal, in g. | 0 | 1.0 | 1.5 | 2.0 |
|--|------|-----|-----|-----|
| NO_3 formed, in μM | 10.2 | 9.5 | 9.4 | 7.1 |
| Time of MB* decoloration, in min. | 58 | 62 | 92 | 100 |

* MB : Methylene blue.

一応両活性は平行する傾向を示すが第 8 表実験 3 のように Methylene blue 脱色能は強くても NO_3 還元力は比較的弱いもの或は実験 1 と 5, 4 と 5 のように同一の NO_3 還元力を示しても Methylene blue 脱色能は著しく異り又逆に Methylene blue 脱色時間には差がなくても NO_3 還元量は数倍も異なる事実、或は第 9 表の活性炭 1.0g と 1.5g 処理

により Methylene blue 脱色力が先づ影響を受け易い事等の点から、NO₂ 還元に Aldehyde dehydrogenase が重要な役割を演じている事は自明の事であつても同一酵素蛋白による反応という事は疑問であり、仮に同一酵素であるとすれば反応に関与する部分が異なるものと推定され廿日鼠肝臓酵素の NO₂ 還元能について Purine 類の阻害試験から得た推論 (未発表) を支持する。

5. Flavin 類の影響 大腸菌の NO₂ 還元酵素に於ては FAD 或は Methylene blue の添加による活性増強が観察されて居り (江上, 佐藤, 1948), 又 Xanthine 酵素, Aldehyde dehydrogenase 等が FAD を含む事は Westerfeld 等も示して FAD が補酵素として関与している事が推定されるが、肝臓の場合非常に堅く結合して透析によつては失われにらしい事は透析酵素液に Acetaldehyde だけを添加して原酵素液に近く或は之を凌駕する程の NO₂ 還元力を恢復する事から推定される。併し一応その影響を試験した。

牛肝臓 70 g を細かく切り 200 ml の水と共に 80° に 30 分加熱し之を Warling blender で homogenize し更に 50 ml の水を加え 80° で 30 分抽出吸引濾過する。残渣について同様の抽出操作を数回反復し濾液を集め 460 ml を得、之を硫酸で飽和して蛋白を沈澱させ遠沈除去する。上澄に 50 ml の Phenol を添加、よく振盪して静置する。得られた濃黄色 Phenol 層約 30 ml から Ether 100 ml, 水 5 ml 混液で振盪抽出する事 2 回、濃黄色の水層約 10 ml を得る。之は八木法 (1953) に倣つた Flavin 抽出であり、Butanol・醋酸・水 4:1:5 の溶媒を用いて濾紙 Chromatography を行い蛍光分析によつて Rf 0.31, 0.10, 0.03 の三成分が検出され明らかに Riboflavin, FMN 及び FAD を含んでいた。之を牛肝-Flavin 抽出液とした。全く同様にして雞肝 90 g より温水抽出液 560 ml, Phenol 層 60 ml を経て水に転溶、約 20 ml の雞肝-Flavin 抽出液を調製した。同様に Chromatogram によつて三成分を含む事を確認したが、蛍光の強さは何れも FMN, Riboflavin, FAD の順であつた。牛肝-Flavin 抽出液を東洋濾紙 No. 2 の Chromatopile を用い前記溶媒によつて三成分を分ち各区を抜き取り暗室で風乾後保存した。FAD 吸着濾紙 15 枚を小さく切片に切り 50 ml の温水で約 20 分抽出、之を数回繰返し浸出液約 200 ml を濾過後減圧濃縮約 5 ml の淡黄色水溶液を得た。之が牛肝 FAD 溶液であつて Chromatogram で Rf 0.025~0.03 に 1 つの Spot を確認した。FMN についても同様に温水抽出濃縮して約 5 ml の黄色水溶液即ち牛肝 FMN 溶液を調製した。之等を透析酵素液に加えてその影響を検した結果を第 10 表に示す。

Table 10. Effect of crude flavin extract of liver on "Dialysed NO₂ reductase."

| Enzyme used | Original extract | Dialysed extract | | | | | |
|-------------------------------|------------------|------------------|--------|---------|-----------|------------|------|
| | | None | FL-FE* | CL-FE** | CL-FAD*** | CL-FMN**** | AA |
| NO ₂ formed, in μM | 10.0 | 7.6 | 12.7 | 11.5 | 9.6 | 7.9 | 11.8 |

* FL-FE: Fowl liver flavin extract.

** CL-FE: Cattle liver flavin extract.

*** CL-FAD: Cattle liver FAD extract.

**** CL-FMN: Cattle liver FMN extract.

尚比較のため Aldehyde 区も設定したが、Flavin 抽出液はその 10 倍 稀釈液、FAD 並に FMN 溶液はそのまま各 1 ml 宛を添加した。試験は定性の域を出ないが Flavin 抽出液或は FAD が活性に関係するらしい様子が推定された。

次いで近藤、奥田両氏から夫々惠贈された結晶 FMN 及び FAD 並に市販 Riboflavin を 25 r 宛透析酵素に加えたが少くも FAD は有効であると思はれる。併しその程度は微弱であり又 FMN は寧ろやや阻害的に作用した。肝臓-Flavin 抽出液が相当の効果を示したが三成分混合物では無効であり、量的の問題或は酸化型、還元型の問題等も関与すると思はれる。

Table 11. Effect of various flavins on "Dialysed NO₂ reductase."

| Added | None | FAD | FAD, FMN | FAD, RF* | FMN | FMN, RF | RF | FAD, FMN, RF | CL-FE** | AA |
|------------------------------------|------|-----|----------|----------|-----|---------|-----|--------------|---------|------|
| NO ₂ formed, in μ M | 3.6 | 5.7 | 3.3 | 3.4 | 2.7 | 2.7 | 3.1 | 2.3 | 16.4 | 22.5 |

* RF: Riboflavin. ** CL-FE: Cattle liver flavin extract.

6. 阻害剤の影響 各種阻害剤の“抽出酵素液”に対する影響を第 12 表に総括する。

Table 12. Effect of inhibitors on NO₂ reduction of "Extract enzyme", in inhibition %.

| Final conc. in M | 10 ⁻² | 5×10 ⁻³ | 10 ⁻³ | 5×10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁴ | 5×10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ |
|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|
| Thiourea | | | 97.4 | 94.7 | 92.1 | 84.2 | 51.1 |
| Oxine* | | | 62.7 | 45.2 | 32.7 | 14.3 | 0 |
| EDTA** | | | 19.1 | 14.5 | 10.2 | 9.4 | 6.0 |
| NaN ₃ | | | 100.0 | 71.0 | 29.0 | 18.5 | 0 |
| KCN | | | 43.1 | 5.9 | 0 | | |
| PCMB*** | | | 98.5 | 79.9 | 8.3 | 0 | |
| MIAA**** | 89.1 | 52.5 | 18.9 | 15.2 | 0 | | |
| Cu ⁺⁺ | | | 100.0 | 100.0 | 45.7 | 20.6 | 17.7 |
| Ag ⁺ | | | 100.0 | 100.0 | 20.6 | 8.8 | 0 |
| NH ₂ OH | 69.4 | 64.2 | 45.5 | 18.7 | 3.7 | 0 | |

* Oxine: 8-Hydroxyquinoline. ** EDTA: Ethylene diamine tetra acetic acid.
*** PCMB: p-Chloromercuribenzoic acid. **** MIAA: Monoiodoacetic acid.

尚此の他に Urethane, NaF 等も試験したが影響は認められなかつた。之等阻害剤には KCN, PCMB, 或は Cu⁺⁺, Ag⁺ 等のように濃度の減少と共に阻害効果を急速に失うもの、阻害作用はそれ程強くなくてもかなりの低濃度迄効果を保持するもの (EDTA, Thiourea) があり、MIAA や NH₂OH は比較的高濃度に於て阻害作用を示した。併し何れにしても之等の結果から金属並に SH 基が活性に関与する事は推定される。

此の場合も脱水素酵素の阻害即ち水素供与の抑制に基づく二次的な影響という事も考えられる。そこで上記阻害剤中代表的なものの Methylene blue 脱色への影響を試験した。既に述べた様に試料によつて脱色能は異なるが第 13 表の各項は同一酵素によるものである事は勿論である。

Table 13. Effect of some inhibitors on methylene blue decoloration of "Extract Enzyme".

| Inhibitor added | None | Thiourea | | | NaN ₃ | |
|----------------------------------|------|------------------|------------------|--|------------------|------------------|
| Final conc. of inhibitor, in M | | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
| Time of MB decoloration, in min. | 59 | 59 | 59 | | 64 | 62 |

| inhibitor added | None | KCN | | | NH ₂ OH | | |
|----------------------------------|------|------------------|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| Final conc. of inhibitor, in M | | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ |
| Time of MB decoloration, in min. | 58 | 65 | 63 | 60 | >120 | >120 | 73 |

| Inhibitor added | None | PCMB | | | |
|----------------------------------|------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Final conc. of inhibitor in M | | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
| Time of MB decoloration, in min. | 5 | 210 | 16 | 12 | 10 |

大部分の阻害剤は同時に Methylene blue 脱色をも遅延させる事が観察されるが, Thiourea のように Methylene blue 脱色には影響しないにも拘らず NO₂ 還元を強力に阻害する点, 或は NaN₃ の様に完全に NO₂ 還元を阻止しても Methylene blue 脱色はそれ程影響されない事から少くも金属が関与する事は確実であると思われる. 併し PCMB の様に NO₂ 還元に影響のない濃度でも尚脱酸素系に多少とも影響する場合は判断の根拠になり得ない事は当然であるが, 水素供与系を含めた over-all の所謂 NO₂ 還元系に SH 基が関与している事は勿論である.

此の他 Purine 類による阻害が又興味ある事実を示すが之に就ては別に報告する.

総 括

- (1) 雞肝 homogenate に硝酸還元酵素作用を確認した.
- (2) 酵素力は 80° 以上では 5 分以内で完全に不活性化されるが 70° では 20 分で約 15% 残存し 60° でも 30 分に約 20% の減少を来した. 而してその不活性化は初期に於ては加熱時間に比例し爾後徐々に終極値に近づく傾向を示した.
- (3) 酵素作用の最適 pH は 5.8 附近にあつて哺乳動物のものと大体一致するが作用 pH 域は更に広がつた.
- (4) 酵素は透析により活性をかなり低下するが透析外液或は加熱肝臓抽出液により一部恢復した.
- (5) 酵素作用は種々の水素供与体によつて影響されないが透析すれば林檎酸, Glutamin 酸, 琥珀酸, 酒石酸, Fumar 酸, 乳酸, Malein 酸, Malon 酸, 枸橼酸により促進さ

れる様になり、之等の脱水素酵素が共扼する事を示した。併し糖類は殆ど影響が認められなかつた。一方原液に於て多少阻害的に働くか殆ど影響しなかつた Acetaldehyde の促進作用が著しく顕著になつた。

(6) 原酵素液に於ける肝臓固有の水素供与体或は透析酵素に於ける Acetaldehyde による Methylene blue 脱色能と NO_2 還元力とは必ずしも平行しなかつた。

(7) 酵素活性に FAD は有効であるが、FMN 或は Riboflavin は効果がない事が示唆された。

(8) 少くも homogenate による NO_2 還元系に金属並に SH 基の関与する事が推定された。

本研究に協力された高橋平八郎、西村浩、重松晴喜、並に FMN, FAD を惠贈された名城大学農学部近藤弘及び名古屋大学医学部奥田潤の各氏に感謝する。尚研究費の一部は文部省科学研究助成費によつた。

文 献

- Bernheim, F. and Dixon, M., (1928): *Biochem. J.*, **22**, 125.
 Dixon, M. and Thurlow, S., (1924): *Biochem. J.*, **18**, 989.
 江上不二夫・佐藤 了, (1948): *日化*, **69**, 160.
 Kielley, R. K., (1955): *J. Biol. Chem.*, **216**, 405.
 Nicholas, J. D. and Nason, A. (1954): *J. Biol. Chem.*, **211**, 183.
 Nicholas, J. D., Nason, A. and McElroy, W. D., (1953), *Nature*, **172**, 34.
 大村浩久, (1954-a): *九大農学芸*, **14**, 415.
 大村浩久, (1954-b): *九大農学芸*, **14**, 423.
 大村浩久, (1956): *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **10**, 365.
 大村浩久, (1957): *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **21**, 126.
 Remy, C. N., Richert, D. A., Doisy, R. J., Wells, I. C. and Westerfeld, W. W., (1955): *J. Biol. Chem.*, **217**, 293.
 Richert, D. A. and Westerfeld, W. W., (1954): *J. Biol. Chem.*, **209**, 179.
 Wackler, B., Mahler, H. R. and Green, D. E., (1954): *J. Biol. Chem.*, **210**, 149.
 Westerfeld, W. W., Richert, D. A. and Higgins, E. S., (1956): "A Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism" (Edited by McElroy, W. D. and Glass, B.), p. 429. The Johns Hopkins Press, Baltimore.
 八木国夫, (1953): 江上等編 "標準生化学実験", p. 158, 文光堂, 東京.

Summary

The activity of nitrate reductase in the fowl liver homogenate was estimated. It was completely inactivated by heating at 90°C for 2 minutes and at 80°C for 5 minutes. However, approximately 15 per cent of the original activity was retained at 70°C and the slight diminution was observed when the enzyme had been heated at 60°C. The enzyme had a tendency to decrease linearly its activity at the initial stage of heating and then to reach gradually to certain final values according to the temperatures. The optimum pH of the nitrate reductase was about 5.8 coinciding with those of mouse and cattle liver enzymes, though the pH range in which the nitrate reductase is acting was much broader than that of both mammalian reductases. Especially, wide plateau of optimum pH existed between 6 and 7 when the enzyme assays were carried out using phosphate buffer.

The enzymatic activity was fallen off considerably by dialysis and restored with the dialysate and boiled extract of liver. Moreover, the activity was also recovered some extent by addition of malate, glutamate, succinate, tartarate, fumarate, lactate, maleate, malonate, and citrate, since native substances which are acting most predominately as hydrogen donator in the liver had been lost by dialysis. However, reactivation with sugars was not observed. The rate of nitrate reduction of the dialysed enzyme was accelerated exceedingly by acetaldehyde which has almost no or slight inhibitory effect on the reductase of the original homogenate. In connection with aldehyde dehydrogenase which was demonstrated so far to be able to reduce nitrate, therefore, some discussions were performed on the active principal reducing nitrate.

It was observed that reactivation of dialysed nitrate reductase was attained by the conjunction of raw flavin extract of liver which contains three components FAD, FMN, and riboflavin. Moreover, it was also suggested that FAD may concern with reduction but both the others not.

From the fact that thiourea, oxine, EDTA, NaN_3 , KCN, PCMB, monoiodoacetic acid, Cu^{++} , Ag^+ , and hydroxylamine inhibited the reduction of nitrate, the participation of metal and SH group in the reaction was presumed.