

## ?肝臓の硝酸還元酵素(III) : 酵素標品について

大村, 浩久  
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21492>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.205-223, 1959-12. 九州大学農学部  
バージョン :  
権利関係 :

# 鶏肝臓の硝酸還元酵素 (III)\*

## 酵素標品について

大 村 浩 久

### On the nitrate reductase of the fowl liver (III) On the preparation of enzyme

Hirohisa Omura

生体組織には種々の酵素の外にこれ等に関与する多くの物質が含まれていて互に影響しながら組織特有の反応系を形成している。従つて組織内に於ける酵素反応の特性を知るには切片乃至ホモゼネートを用いて研究する事が好ましく従来は組織の磨碎懸濁液を 3000 r.p.m. で 5~10分遠心分離して粗大部を除いたホモゼネートを酵素液とした。雞<sup>1)</sup>と廿日鼠或いは牛<sup>2)</sup>の肝臓による硝酸還元酵素作用には水素供与系としての種々の脱水素酵素との共働関係及びアルデヒドの影響<sup>3)</sup>若しくはプリン類の反応阻害<sup>4,5,6)</sup>等に多少の差異が観察された。特に後者は硝酸還元酵素の本体に関するアルデヒド乃至キサンチン酸化酵素説<sup>7,8)</sup>や哺乳類で尿素、鳥類では尿酸を最終生成物とするプリン代謝系の相異等と関連して興味が深い。併しこれ迄の経験では肝臓組織内に含まれている低分子物質の種類、量等によつて支配される反応系が動物でそれぞれ異なつているために硝酸還元酵素作用にも影響して間接的に若干の相異を惹き起し、観察された差異が酵素の本質そのものに基くものであるかどうかは疑問であつた。

一方牛肝酵素の部分精製を行いその性質を報告した。<sup>9)</sup>特に本酵素がアルデヒド及びキサンチン酸化酵素と密接な関係を持ちこれ等の酵素活性は常に伴われるがその作用力は必ずしも平行するものではない事を観察した。この事は鶏肝透折ホモゼネートについても略々同様であるが酵素そのものの性質をより明確にするために今回は牛肝の場合に倣つて精製した酵素標品について実験した。

## 実 験

### 酵素標品の調製

牛肝の場合と略同様にして調製出来ることが判つたので次のように行つた。新鮮肝臓をよく水洗し鉄で小片に切り等量の pH 7.2 の 0.05M 磷酸緩衝液に Warling ブレンダーでホモゼネートを作る。之を予め 60~70° に加熱した 4 倍量の緩衝液に烈しく攪拌しながら徐々に添加、55° に 5 分間保つた後流水で急冷する。3000 r.p.m. で 30 分間遠心分離し上澄に硫酸結晶を溶解 0.6 飽和とし暫く放置した後沈澱を遠心分離して集める。之を再び同

\* 硝酸還元酵素に関する研究、第 15 報。

じ緩衝液に溶かし硫酸 0.2 飽和とする。生成した沈澱を遠沈除去し上澄を 0.5 飽和として析出した沈澱を集める。次に今度は水に溶かした後硫酸 0.25 乃至 0.5 飽和間の沈澱を集める。この沈澱の溶液はかなり強い酵素力を持つが黄赤褐色を呈し然も多少濁っている。そこで沈澱を水に溶かし磷酸石灰ゲルを加え暫く攪拌した後遠心分離する。数回繰返すと酵素は殆ど完全にゲルに吸着され残存液は無色透明になる。次いで pH 7.2 の 0.25M 磷酸緩衝液でゲルから溶出、淡黄色稀に淡黄褐色の透明な溶出液が得られる。これから硫酸 0.6 飽和で塩析、遠心分離して集め更に Büchner 漏斗を用いて吸引濾過出来るだけ脱水してから冷蔵庫に保存する。ゲルを詰めた吸着柱に酵素水溶液を通して吸着、水を通して洗滌後 0.25M 緩衝液で溶出してもよいが多量の試験には適当しない。ゲル処理で濁濁部が最も吸着され易く溶出されにくい事が示唆されるので酵素水溶液に少量のゲルを加えて液を透明にし硫酸沈澱を行つてもよい。この酵素標品は水或いは緩衝液に非常に溶け易く透明な溶液となつて、15000 r.p.m. で 60 分間 高速遠心分離を行つても殆ど沈澱を生じないで完全に溶解している事を示した。

大腸菌々体を超音波で破壊しその抽出液を透析後硫酸飽和度 0.2 及び 0.5 の間の沈澱を真空デシケーター中で乾燥すると硫酸結晶の混つた乾燥酵素標品が得られ真空デシケーター中水室に保存すれば数か月間はその活性を維持するという。<sup>10)</sup>之に対し肝臓酵素剤は更に減圧乾燥或いは凍結乾燥すれば著しく変性されて暗赤褐色の膠様物質に変化して硫酸結晶中に混在し然も難溶性となつて酵素活性をも失う。この変性は濃厚硫酸によるものと考えられる。事実酵素液を流水透析して硫酸を除いた後に凍結乾燥すれば褐変膠化は避けられて淡黄褐色の粉末標品が得られるが溶解度を多少減ずる程度であつた。併し活性は完全に失われた。勿論透析によつて活性の低下は起るが完全に消失する事はなかつたので乾燥

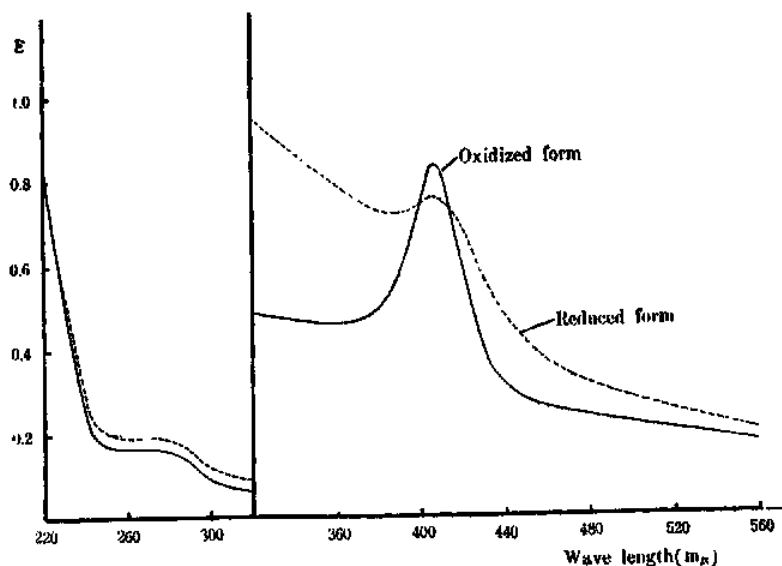


Fig. 1. Absorption spectrum of enzyme preparation.

によつて失活すると思われる。従つて酵素標品は或る程度湿つた状態に保つ事が必須の条件であり Büchner 漏斗上で出来るだけ吸引した状態で冷所に保存する事が好ましい。

これ等の性質は細菌酵素と顕著な対比を示すものであるが牛及び廿日鼠の肝臓酵素とは何れも全く同様であり精製による活性の増加も略同程度に達成された。併し水溶液の吸収スペクトルは特に紫外部に於て明白に異なつている。第1図は Beckman DU 型分光光度計を用い酵素標品 25 mg を 10 ml の水に溶かして可視部、それを更に 10 倍 稀釈して紫外部のスペクトルを測定したものであり還元にはヒドロサルファイトを用いた。

可視部では牛の酵素と同様に 405 m $\mu$  附近にピークがあるが紫外部では 250 m $\mu$  附近から 280 m $\mu$  に亘つて平板であつて牛の場合のような特有の山は見られなかつた。還元すれば紫外平坦部を含めて全域に亘り一般に吸収が若干宛増加し 405 m $\mu$  付近の吸収だけは逆に減少した。

この様にして調製した標品は第1表に示すようにながりの長期間使用に耐える活性を保持する。酵素の活性は調製後 0' 乃至 3' の氷室に保存した同一製剤 20 mg 宛について 2 日及び 45 日後に後述する条件で測定したものであつて 1 カ月半後も尚使用し得た。Fe<sup>2+</sup> の効果についても後で示す。

Table 1. Preservation of enzyme preparation.

Days	2		45	
Fe <sup>2+</sup> , 10 <sup>-8</sup> M	—	+	—	+
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	34.0	74.5	9.0	10.5

pH 6.0, 40°C, 120 min.

#### 酵素作用の測定

大腸菌酵素では硝酸脱水素酵素が含まれているため蟻酸を加えて同酵素を水素供与系として硝酸還元酵素に共働させて反応を測定している。肝臓ホモゼネートの場合組織に尙有の水素供与体が含まれているために基質を特別に加える必要はなく又更に透析しても尚若干の活性を示した。併しアセトアルデヒドの外種々の有機酸を添加すれば或る程度活性が復活した。後者の中では特に林檎酸、グルタミン酸及び琥珀酸が有効であつて 0.01M 程度の添加で何れも無添加反応区の 2 倍を凌駕した。牛肝精製酵素ではアセトアルデヒドが水素供与体として酵素活性の発現に不可欠であつてその他の有機酸類は殆ど効果が無かつた。鶏肝酵素に於ても第2表に示すように全く同様であつて、この事はホモゼネート中に共存する種々の脱水素酵素が上記精製過程に於て除去若しくは不活性化された事を示唆しメチレンブルー脱色試験でも確かめられた。従つて水素供与体を添加しても硝酸還元酵素に共働する脱水素酵素が作用していないために反応は起り得ないと思われる。

Table 2. Hydrogen donator.

H-donator, 10 <sup>-2</sup> M	None	Acetaldehyde	Malate	Glutamate	Succinate	Citrate
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	0.5	33.0	2.1	1.1	1.0	0.4

Enzyme 25 mg, pH 6.0, 40°C, 120 min.

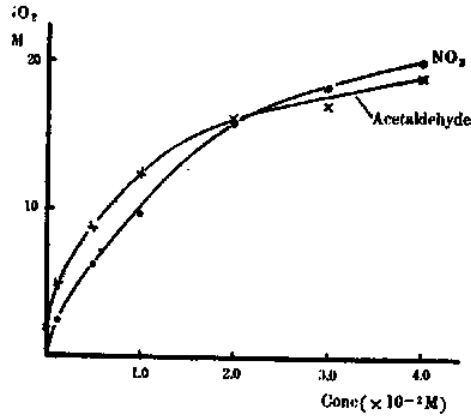


Fig. 2. Effect of amounts of nitrate and acetaldehyde on the nitrate reduction.

牛肝酵素の反応系に於て 0.02M 以上の硝酸塩及びアセトアルデヒドでは亜硝酸生成量は略一定に達する事が観察されたので爾後その量を用いてきた。雞肝酵素でも概ね同条件が踏襲出来る事が第2図から明らかになつたので特記しない限り之を用いた。

酵素活性が酵素量並びに反応時間と直線関係にある事は粗酵素液でも報告した所であるが第3図のように精製酵素に於ても勿論確められた。

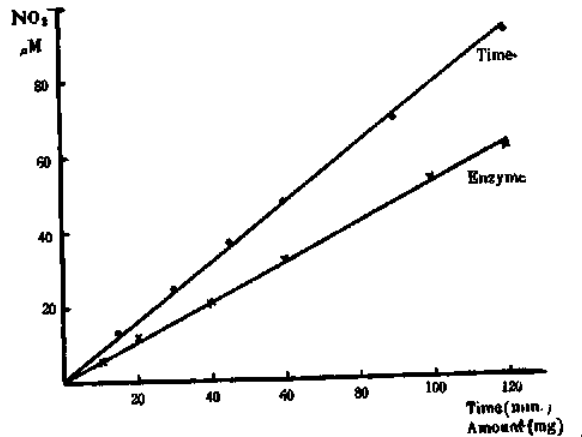


Fig. 3. Effects of the reaction time and amounts of enzyme preparation on the nitrate reduction.

亜硝酸の定量は常法通り醋酸ウラニウムで除蛋白した清澄な反応液を Griess 氏試薬で発色させ、その赤色の強さを日立光電比色計で緑色フィルターを用いて測定しているが、5乃至15 $\mu$ Mの亜硝酸濃度が好適である。後述するように酵素標品の活性は原料肝臓によつてかなり変動するので各酵素剤について適当量を予め求めておく事が好ましい。亜硝酸生成量が非常に多い場合は発色試薬によつて直ちに沈澱を生ずるので適宜稀釈した後に発

色しなければならぬ事は当然である。而して又酵素液は各試験について同時に調製し必要量宛分配しなければならぬ事も勿論である。

### 最適温度

牛肝酵素での硝酸還元は 55° で活性が最も強いが  $Fe^{++}$  を添加した場合はその最適温度は 50° に低下した。雞肝酵素では更に高く  $Fe^{++}$  を添加しても尚 60° に至適値を持つ事が示された。これは鳥類の体温が哺乳類のものよりも高く耐熱性が大きいと考えられる事と関係があるのではないかとと思われる。温度が更に高ければそれだけ酵素自身熱変性のため活性が低下するので反応時間とも関係があると思われるが、第4図に示すように少なくとも2時間以内では至適値に変化がなかつたが 70° では既に亜硝酸生成量は略同一であつた。併し牛肝の場合にも述べたように反応を嫌氣的に行うため突沸が甚しく実際上の操作に困難であつたので、特記する以外は従来同様 40° で測定した。

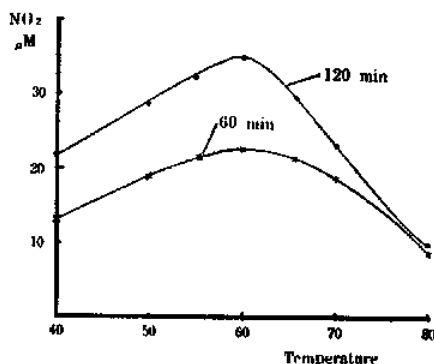


Fig. 4. Effect of reaction temperature on the nitrate reduction.

### 最適 pH

牛肝粗酵素液での最適 pH は 5.8 附近であつて肝臓磨碎液の pH と大体一致したが、江上氏等<sup>11)</sup> が同氏等の酵素標品について報告した約 7.6 とはかなり異なつていた。これは酵素の精製度の相異によるものであつて精製を重ねるに従つてアルカリ側に移動し一致するに至るものではないかと考えた。然るに確安分別を繰返し磷酸石灰ゲル処理を行い当時江上氏等が用いた標品よりも更に純度が高いと思われる酵素標品についても 5.8 附近にあつて粗酵素液のものと同じ一致した。雞肝粗酵素液の最適 pH も同様に 5.8 附近にある事は既に報告したが、精製酵素についても第5図に示すように同一 pH 値を示し牛肝の場合と全く同様であつたが、更に酸性側 4.2 乃至 4.5 附近に第2の山が観察された事は雞肝酵素特有の現象であつた。

### 金属の影響

牛肝酵素の調製に際し活性が急激に低下する事を屢々経験し  $Fe^{++}$  によつて恢復される事が観察された。雞肝酵素に対しても第3表に示すように  $Fe^{++}$  が有効である事は明らかである。

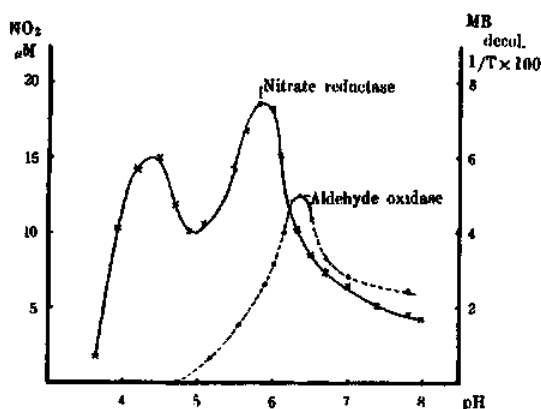


Fig. 5. Effect of pH on the nitrate reductase and the aldehyde oxidase.

Table 3. Effect of Fe<sup>2+</sup>.

Conc. of Fe <sup>2+</sup> , × 10 <sup>-3</sup> M	0	0.05	0.1	0.5	1.0	2.0
NO <sub>2</sub> formed, μM	6.8	7.1	8.6	8.8	9.8	12.9

本試験に於ては夾雑する金属の除去には特別に考慮はしなかつた。即ち硫酸は市販一級試薬をそのまま用い、蒸溜水は当研究室の金属製蒸溜水製造装置で調製したものであり、緩衝液、硝酸塩溶液等は この蒸溜水を用いて再結したもから調製した。蒸溜水は比抵抗  $15 \times 10^4 \Omega \text{cm}$  位であつてデチゾン試薬でかなりの呈色を示し、又当研究室の水道水は殆ど零、日本オルガノ商会製イオン交換純水製造装置で蒸溜水を更に処理したものは  $50 \sim 100 \times 10^4 \Omega \text{cm}$  を示した。従つて反応系には相当量の金属が含まれている筈であつて、此の状態で尚 Fe<sup>2+</sup> が有効である事を第3表の結果は示すものである。

之に対して他の金属イオンは Fe<sup>2+</sup> を含めて賦活効果を示すものは認められず却てその中の二、三は阻害した。

Table 4. Effect of metal ions.

Metal, 10 <sup>-3</sup> M	None	Fe <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cu <sup>2+</sup> *	Cu <sup>2+</sup> *
NO <sub>2</sub> formed, μM	26.8	26.3	19.5	20.6	17.4	22.3	14.2	19.5

\* 10<sup>-4</sup>M.

牛肝酵素でも阻害作用を確認した Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> の外に Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 等も明らかに反応を抑制した。Cu<sup>+</sup> 及び Cu<sup>2+</sup> は 10<sup>-4</sup>M を試験したが尚強い阻害を示しホモゼネートで既に報告した所と一致した。

酵素の活性が緩衝液の種類で異なり醋酸塩に於て磷酸塩を用いた場合よりも有効な事は既に屢々報告したが雞肝精製酵素でも同様であつた。しかし Fe<sup>2+</sup> による賦活効果は牛肝の場合と等しく磷酸緩衝液で著しい事は第5表の結果から明らかである。

Table 5. Effect of buffer.

Buffer, $5 \times 10^{-2}M$ , pH 6.0	Phosphate		Acetate	
	—	+	—	+
Fe <sup>2+</sup> , $10^{-3}M$				
NO <sub>2</sub> formed, $\mu M$	28.5	42.5	33.5	37.5

この事は酵素の特性よりむしろ緩衝液自体の性質によるものと考えられ、ピロリン酸塩が金属とキレート結合を生ずる点などから説明を示唆されると思われる。

### 阻害剤の影響

ホモゼネートについて既に種々の金属並びに SH 試薬が阻害する事を示したが、第6表に精製酵素を用いて試験した結果を一括表示する。

Table 6. Effect of inhibitors.

Inhibitor	Conc. M	Inhibition, %		Inhibitor	Conc. M	Inhibition, %	
		—	+			—	+
Fe <sup>2+</sup>	$10^{-3}$			Fe <sup>2+</sup>	$10^{-3}$		
NaN <sub>3</sub>	$10^{-3}$	100	100	KCN	$10^{-3}$	21.4	23.8
	$10^{-4}$	35.5	50.8		$5 \times 10^{-4}$	5.4	5.8
	$5 \times 10^{-5}$	28.9	39.0		$10^{-4}$	0	0
	$10^{-5}$	0	23.7				
Thiourea	$10^{-3}$	54.4	31.8	Monoiod acetic acid	$10^{-3}$	21.0	25.5
	$5 \times 10^{-4}$	32.4	25.2		$5 \times 10^{-4}$	8.8	20.4
	$10^{-4}$	10.0	0	p-Chloro mercuri benzoic acid	$10^{-4}$	42.1	100.0
8-Hydroxy-quinoline	$5 \times 10^{-4}$	68.3	89.4		$5 \times 10^{-5}$	11.8	52.6
	$10^{-4}$		67.7		$10^{-5}$	0	0
	$10^{-5}$	11.0	24.8				
Ethylene diamine tetra acetic acid	$10^{-2}$	16.1	48.4	Cu <sup>+</sup>	$10^{-3}$	100	
	$10^{-3}$		39.7		$10^{-5}$	46	
	$10^{-4}$	8.6	11.1	Cu <sup>2+</sup>	$10^{-3}$	100	
			$10^{-5}$		25.9		

酵素の精製によって特にアザイド、8-ヒドロキシキノリンによる阻害度は増したが、チオ尿素や PCMB 阻害は緩和される等多少の変動はあつたがホモゼネートと全く同様に金属及び SH 基の関与が示唆された。一般に Fe<sup>2+</sup> 添加反応系で阻害度が大きい事は金属試薬については当然考えられる所であるが、モノイード酢酸や PCMB 等 SH 試薬に於ても Fe<sup>2+</sup> 区で強い阻害を示した。これ等の点から精製途中に解離し易い Fe<sup>2+</sup> イオンの他に尚金属が含まれて居り SH 基と共に酵素作用に関与する事が推定される。更に解離し易い Fe<sup>2+</sup> の酵素への関与、恐らく酵素との結合には少なくとも SH 基が関係していると思われる。チオ尿素の場合 Fe<sup>2+</sup> 添加区に於て却て阻害度を減少しているが、この原因については判らない。

### 水素供与系

水素供与体としてアセトアルデヒドが不可欠の事は既に述べたが、この事は古くから主張されてきたアルデヒド酸化酵素説を裏付けるものとも思われる。しかしアルデヒド酸化酵素と硝酸還元酵素との両活性が必ずしも平行しない事をホモゼネートで既に確めたが、



精製酵素でも同様であつた。第 7 表は異なつた個体肝臓から同一の条件で調製した酵素標品 20mg 宛を用い同一条件で硝酸還元及びメチレンブルー脱色試験を行つたものである。アセトアルデヒドを加えなければ両活性が認められない事は勿論である。

Table 7. Activity of the nitrate reductase and the aldehyde oxidase of several enzyme preparations.

Prep. No.	1	2	3	4	5	6	7	8
NO <sub>2</sub> formed, μM	60.0	44.5	42.8	38.2	32.0	31.6	18.6	3.7
Time of MB decoloration, min.	36	30	69	92	20	45	58	∞

∞: Dye was not decolorized in 120 min.

Enzyme preparations were purified by the same procedure, but from different livers of fowl. Assays of activities were performed under the same condition using 20 mg of preparations, respectively.

而して多数の材料での経験では脂肪分の多い黄褐色の肝臓よりも赤褐色のものが原料として好ましく、強い活性を持つ酵素標品が得られるようであつた。

又メチレンブルー脱色で測定したアルデヒド酸化酵素力の最適 pH は 6.3 附近であつて第 5 図に示すように硝酸塩還元のものよりも若干アルカリ側にあつて、両酵素の差異を示唆する一根據でもある。

キサンチン酸化酵素との関係についても、この酵素の基質キサンチン及びヒポキサンチンの添加でホモゼネートの酵素力を強く促進するにも拘らず硝酸塩の還元を抑制する事を観察したが、後に示すようにキサンチン、ヒポキサン自身水素供与体の能力を持つ事はアルデヒド酸化酵素と同様にキサンチン酸化酵素説をも無視する事は出来ない理由であるが、これ等の点を考慮して前報で主張したように硝酸還元酵素はアルデヒド及びキサンチン酸化酵素と同一若しくは異なるにせよ少なくとも活性中心は異なると推定出来る。

粗酵素液を透析すれば活性を低下するがアセトアルデヒド或いは林檎酸等の有機酸類で或る程度恢復される外に粗フラビン抽出液も有効である事は前報で述べた。この抽出液は精製酵素に対する水素供与体としてアルデヒドに代り得る事は第 8 表から明らかであつて、その効力を持たない上記有機酸類とは異なつている。フラビン抽出液は前報記載のものであつて 10 倍稀釈液を 15mg 当りの酵素にそれぞれ添加した。

Table 8. Effect of raw flavin extract.

Flavin extract, ml	0	1.0	0.5	0.1	0.05	0.01
Acetaldehyde, 2×10 <sup>-2</sup> M	-	+	-	-	+	-
NO <sub>2</sub> formed, μM	0	19.6	17.2	22.8	34.4	20.9
						12.4
						3.1

フラビン抽出液の添加量が多いと却て亜硝酸生成量を減少するようであり又アセトアルデヒドの効果に対する促進作用ははつきりしなかつたが、ホモゼネートのように打消す事は認められなかつた。

次に Le Page<sup>12)</sup> の方法に従つて酵母から DPN 製剤を調製した。2 ポンドの市販パン酵母を 90 乃至 92' に保ちながら熱水 80 ml に烈しく攪拌しながら添加、約 8 分間で加え終り加熱を止め速かに室温迄冷却、80 乃至 100 g の Super Cel を加え大型 Büchner 漏斗を用いて吸引濾過、黄色微濁の濾液 915 ml を得る。之にその 1/10 容の 25% 塩基性醋酸鉛溶液を加えアンモニア水で pH 8 に調節する。生じた沈澱を濾別した淡黄色の略々透明な濾液を醋酸で pH 6.5 とし 25% 硝酸銀溶液 11.5 ml を攪拌しながら加え冷蔵庫に一晩放置する。上澄液の大部分を傾瀉して除き残りを遠心分離する。沈澱を蒸留水で洗滌後 10 乃至 15 ml の蒸留水に分散し硫化水素ガスを通じて硫化銀を沈澱させる。遠沈後沈澱を再び水で洗い上澄液に洗液を合わせ 40 ml の黄色、稍々粘稠な溶液を得る。之を通気して硫化水素を除いた後 5 倍容積の冷アセトンを加え一晩冷蔵、生じた沈澱を遠心分離して集め 3 回冷アセトンで洗つた後減圧乾燥して約 100 mg の白色粉末を得た。Warburg, Christian 法<sup>13)</sup> に従いハイドロサルファイトで還元し 340 m $\mu$  の吸光度を分光光度計で測定、この値から純度を求め DPN 約 24% であつた。

この標品を水に溶かし 1 mg 宛を 25 mg 酵素に添加して生成亜硝酸量を測定した。尚同時に水素供与体との共同作用をも試験した。

Table 9. Effect of raw DPN solution.

H-donator, 10 <sup>-2</sup> M	—		Glucose		Glutamate		Succinate		Malate		Citrate		Acetaldehyde	
	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
Raw DPN, 1mg	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—	+	—
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	6.9	0.4	6.6	0.7	7.9	0.5	5.7	0.6	3.5	0.8	9.8	16.8	11.1	

DPN 溶液自身或る程度の水素供与体として有効な外グルタミン酸或いはクエン酸により活性化され、一方アセトアルデヒドの効果を減殺し林檎酸、琥珀酸でも亜硝酸の生成量を減ずる傾向が見られたが粗製品のため確証は得られない。しかし少なくとも本標品が水素供与体としてアルデヒドに代り得る事は明らかである。

ホモゼネートでは外部から特別に水素供与体を加えなくても還元反応が行われる事は肝臓そのものが固有の基質を含む事を示唆するものであるが、第 10 表の結果は更に雞肝酵素に対し雞肝臓だけでなく心臓脾臓等他の器官或は廿日鼠等他の動物の肝臓にも基質が含まれている事を示した。組織抽出液は何れも水に磨碎懸濁し 5 分間沸騰水に浸漬して酵素活性を除き冷却後 10000 r.p.m. で 30 分間遠心分離した黄色透明な上澄液であつて適宜必要量宛添加した。

Table 10. Effect of tissue extracts.

Enzyme prep. No.	1		2		3		
Amounts of enzyme, mg	15		30		50		
Tissue	fowl liver		fowl heart		fowl spleen		mouse liver
Amounts of tissue, g	0.2		0.4		0.4		0.3
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	9.3		70.5		51.0		37.4

Tissue extract was boiled for 5 min. to destroy the enzyme activities.

透析ホモゼネートの活性が透析外液によつて恢復し然も牛肝のものでも等しく有効である事を既に報告した。これは補酵素等の補充に基く事も考えられるがアルデヒドのみによる顕著な恢復現象から主として水素供与体の効果である事が想像される。雞肝 37g を水に磨碎懸濁し 12000 r.p.m. で 60 分間遠心分離、透明な上澄液 90 ml を得る。これを 2l の蒸留水に対し 2~4° の氷室中で 40 時間透析、外液を沸騰水浴上で濃縮、生成沈澱を濾別し黄褐色透明濾液を原組織 1g 当り 1 ml とするに 37 ml とし、必要量を酵素 30 mg 宛に添加した。

Table 11. Effect of dialysate of liver extract.

Dialysate, ml	0.5	1.0	0.5	0
Acetaldehyde, $2 \times 10^{-2} M$	—	—	+	+
NO <sub>2</sub> formed, $\mu M$	16.0	20.4	23.2	44.0
Time of MB decoloration, min.	14		39	58

第 11 表に示すように透析外液の基質効果が確認されたがアセトアルデヒドが共存するとアルデヒド単独の場合の硝酸還元をかなり抑制する。これはホモゼネートに対するアルデヒドの影響は殆ど無いかむしろ阻害的であるが透析すれば促進的に作用し原酵素液の活性をも凌駕する事実とよく一致する。

組織成分は極めて複雑であつて固有基質が単なる一種類に限定されるとは思われないがその解明は非常に困難である。しかし第 12 表の結果は少なくとも数種類の基質が存在することを暗示する。前回同様肝臓組織 5g からの透析外液を濃縮し析出した沈澱を濾別、5 ml の水に懸濁して“不溶区”とする。黄褐色透明濾液も 5 ml とするが之は第 11 表で既示したように水素供与体を含む。これをエーテル 50 ml で抽出、水層に更に水 5 ml を添加し沸騰水浴上でエーテルを除くと同時に濃縮し再び 5 ml とし黄褐色の“エーテル不溶区”を得る。エーテル層にも水 10 ml を添加し同様に沸騰水浴上でエーテル除去濃縮し 5 ml の無色“エーテル可溶区”水溶液を得た。これは等量の 10% トリクロール醋酸、多量のアルコール或いはアセトンを加えても何等沈澱を生じない。“エーテル不溶区”に 5 倍容量の無水アルコールを加え遠心分離して生じた沈澱を除き、上澄アルコール層を蒸発乾涸し無水アルコールに溶解する。無色のアルコール層を再び蒸発乾涸、水に溶かして 5 ml に戻し“アルコール可溶部”とする。暗褐色粘稠のアルコール不溶沈澱は無水アルコール不溶部と共に合わせて水に溶かし黄褐色水溶液を蒸発乾涸してアルコールを除き再び水に溶かして 5 ml に復し“アルコール不溶区”とする。この一部を蒸発乾涸してアセトンに溶かしたが殆ど溶解せず又アセトン層を乾涸しても固形物は認められなかつたので“アルコール不溶区”はアセトンにも溶解しない事を示した。これ等の各フラクションは何れも量的には 1 ml が原組織 1g に相当するがこの各々についてその水素供与能を検査した。酵素量 50 mg 宛を用い尚比較のために  $10^{-2} M$  アセトアルデヒドと琥珀酸をも供試した。こうして少なくとも 4 種の水素供与体の存在が推定される。

Table 12. Effect of some fractions of liver dialysate.

Fraction	Insoluble	Ether-sol.	Ether-insol.	Alcohol-sol.	Alcohol-insol.	Acetaldehyde	Succinate
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	12.6	14.9	20.2	14.2	9.8	19.2	0.8

Amounts of each fraction of liver dialysate are corresponding to 1g of original tissue, and those of acetaldehyde and succinate are  $10^{-2}$ M in final concentration.

種々の脱水素酵素が組織化されている粒子ミトコンドリアが細胞内代謝に於て果たす役割は極めて大きい事はよく知られている。硝酸還元酵素の肝臓細胞内分布を追求しこの活性が主として細胞質部に含まれて居り同じく細胞液に溶存する水素供与体と共に硝酸塩の還元を行う事が確められた。しかしミトコンドリアも水素伝達系として水素供与体と硝酸還元酵素間の水素移動を仲介する外粒子の固有活性が水素供与系として有効な事も廿日鼠及び牛肝臓で観察した。<sup>14, 15)</sup>

雞肝 6g から常法に従つて等張蔗糖溶液で分別遠心分離操作によつてミトコンドリアを分離、12ml 蔗糖懸濁液を調製、30mg 酵素に二、三の水素供与体と共に 1ml 宛作用させた。

Table 13. Effect of mitochondria.

Particles	Mitochondria, 0.5g*					—
	—	Succinate	Glutamate	Malate	Acetaldehyde	Acetaldehyde
H-donor, $10^{-2}$ M	—					
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	7.0	9.7	9.2	8.3	26.0	16.0

\* Amounts of mitochondria correspond to the weight of the original liver from which particles had been isolated.

市販雞肝から粒子を分離したためミトコンドリアの活性が弱い事は避けられないが、雞に於ても水素供与系として有効であり更に水素伝達の仲介をなす事は明白であつて酵素の細胞内挙動解明の一端緒を暗示するものと思われる。

#### 酵素の酸処理

酵素の活性-pH 曲線が 5.8 附近と共に 4.2~4.5 の酸性域に第 2 の極大値を示す事は既に指摘した。上述のように酵素液は透明であるが、40' 2 時間後の反応液は pH 6 乃至 5.3 では濁濁、5.2 乃至 4.8 では凝集沈澱を生じて管底に沈んで透明な上澄を残し以下 4.7 附近迄は少量の沈澱を伴つた濁濁液であり、4.6 乃至 4.2 附近は濁濁、それ以下は微濁状態であつた。この事は酸性で酵素蛋白が沈澱を生ずる事を示し特に 5.0 を中心とする附近に等電点を持つ事を暗示する。然も尚かなりの酵素活性を残す事は活性-pH 曲線と共に耐酸性を示唆するものでもある。

酵素 50mg を 4ml の水に溶解し 5ml の 0.1M 醋酸緩衝液、pH 5.0 を加える。40' に 30 分間保持して沈澱を生成し遠心分離して黄色透明な上澄液を水で 10ml とし“酸可溶区”とする。沈澱を 5ml の同じ醋酸緩衝液に再懸濁し洗滌後遠沈する。この沈澱を極く少量の 0.05N 苛性ソーダに溶解し水を加えて 10ml とし黄色透明な溶液“酸沈澱区”を得た。この両者について可視部、更にそれぞれ水で 5 倍稀釈して紫外部の吸収スペクトル

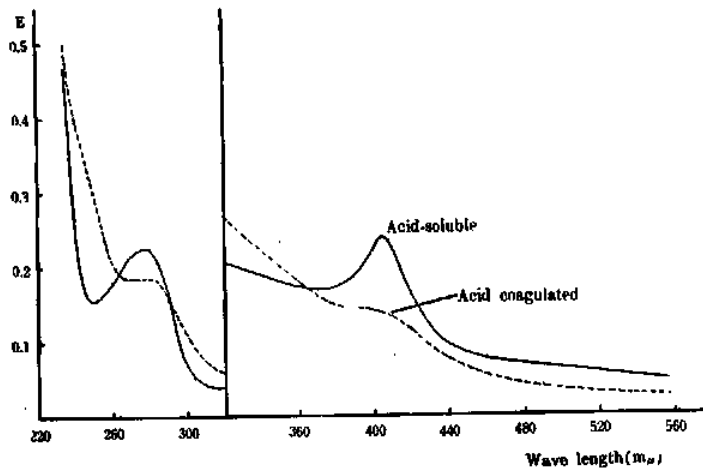


Fig. 6. Absorption spectra of the acid-treated fractions.

を測定した。第6図に示すように“酸可溶区”では紫外部の特徴ある平坦域は消失して276 $m\mu$ に吸収極大を示し、可視部に於ては405 $m\mu$ のピークは残つたが380 $m\mu$ の極小との吸収比は小さくなり所謂吸収の山は低くなつた。一方“酸沈澱区”では紫外部の平坦面は残つたがその範囲は266乃至280 $m\mu$ 間に狭められた。然るに可視部のピークは消え400 $m\mu$ 附近に肩としてその名残を留めるに過ぎなかつた。

両フラクションの酵素活性は次のようにして測定した。酵素210mgを1.5 $ml$ の水に溶解、pH 5の0.1M 醋酸緩衝液5 $ml$ を添加し40°30分加温して沈澱を生成させ遠心分離し、上澄に水を加えて7 $ml$ とし“酸可溶”酵素液とした。一方沈澱を同じく5 $ml$ の醋酸緩衝液に懸濁し更に水で全量7 $ml$ とし“酸沈澱”酵素液とした。原酵素15mgに相当する両酵素液それぞれ0.5 $ml$ 宛を各pHの0.1M 磷酸及び醋酸緩衝液5 $ml$ 宛に加えて反応酵素液とし、以下常法に従つてその活性を測定した。“酸可溶酵素区”の反応液は透明であつたが“沈澱区”は淡く白濁した。

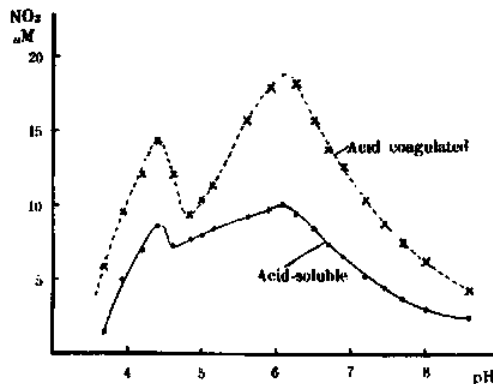


Fig. 7. Effect of pH on the acid-treated nitrate reductase.

第7図に示すように両区共に活性を持ち然も等しく原酵素と類似の活性-pH 曲線を示した。

酵素活性は何れもアセトアルデヒドを水素供与体として添加して測定しているが、キサンチン酸化酵素が常に相伴われる事は避けられず又同時にキサンチン、ヒポキサンチンも水素供与体としての能力を示す事は既に述べた。酸処理で分けたフラクションについて両酵素の活性を求めた結果を第14表に示す。

Table 14. Activities of nitrate reductase, xanthine oxidase and aldehyde oxidase of acid-treated enzyme.

Fraction	Original			Acid-precipitated			Acid-soluble		
	Acetal-dehyde	Xanthine	Hypo-xanthine	Acetal-dehyde	Xanthine	Hypo-xanthine	Acetal-dehyde	Xanthine	Hypo-xanthine
NO <sub>2</sub> formed, μM	23.6	10.8	5.2	7.5	4.3	2.4	8.3	4.5	2.2
Time of MB decoloration, min.	∞	15	29	180	92	∞	∞	48	100

∞ : MB could not be decolorated in 180 min.

両区の吸収曲線はかなり異なっているにも拘らず硝酸還元酵素作用と共にキサンチン酸化酵素力も共に認められた。酵素は元来完全に溶けていたが酸処理によつて変性されて一部は沈澱し水或いは磷酸緩衝液への溶解度を著しく減じたが尚活性は保持した。

次に酵素 200mg を 1.5ml の水に溶解し前回同様 5ml 酸処理を行い遠沈、6.5ml の“酸可溶”酵素液を得る。沈澱を今回は 0.05N 苛性ソーダ 2ml に溶解し更に水 4.5ml を加えて“酸沈澱”酵素液とする。両区共にセロファン膜を用い 18 時間流水透析を行い“酸可溶”酵素区は少量の生成した沈澱を遠沈除去する。沈澱区は透析による pH の低下と共に再び沈澱が多量析出したが、遠心分離して上澄を“酸沈澱-a”区、析出沈澱を 0.05N 苛性ソーダ 2ml に再び溶解し水で 6.5ml とし“酸沈澱-b”区とする。それぞれ 1ml を pH 6.0 の 0.1M 磷酸緩衝液 5ml に加えてその活性を測定した。水素供与体としてアセトアルデヒドは  $2 \times 10^{-4}M$  溶液 1ml、フラビンは既述の 10 倍稀釈フラビン抽出液を 0.5ml 宛添加した。pH の関係はあるが第 15 表の結果は“酸沈澱区”の活性が少なくとも溶解状態にあることを示唆した。

Table 15. Activity of dialysed acid-treated fraction.

Enzyme	Acid-soluble		Acid-precipitated-a		Acid-precipitated-b	
pH	6.0		6.0		8.3	
H-donator	Acetal-dehyde	Flavin	Acetal-dehyde	Flavin	Acetal-dehyde	Flavin
NO <sub>2</sub> formed, μM	5.4	4.0	6.7	4.2	1.1	1.1

酸分別両区を再び酵素標品として調製した。常法で調製した酵素標品 2g を水 5ml に溶解し、25ml の醋酸緩衝液で両区に分ける。黄褐色透明な“酸可溶”酵素液に硫酸を加えて 0.6 飽和とし 2 時間後遠心分離、沈澱を吸引脱水して淡黄褐色標品を得る (500mg)。“酸沈澱”区は醋酸緩衝液で洗滌後 0.01N 苛性ソーダ 25ml に溶解し、黄褐色透明な溶液

を得、同様に硫酸 0.6 飽和で塩析し暗赤褐色の酵素標品を得た (900 mg).

各 150 mg 宛を pH 6.0 の 0.1M 磷酸緩衝液に溶解或いは細かく懸濁しそれぞれ 15 ml とし、5 ml 宛について活性を測定した。可溶区標品は勿論溶解し黄褐色透明の酵素液となった。

Table 16. Activity of acid-treated enzyme preparation.

Preparation	Soluble-prep.			Precipitated-prep.		
	Acetaldehyde	ML-Ext.	Acetaldehyde+ML-Ext.	Acetaldehyde	ML-Ext.	Acetaldehyde+ML-Ext.
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	6.9	6.3	6.5	4.0	5.5	6.9

ML-Ext: Mouse liver extract.

アルデヒドは常法通り終濃度  $2 \times 10^{-2}$ M, 廿日鼠肝臓抽出液は原組織 0.3g に相当する加熱抽出液 1 ml を添加した。

沈澱区の酵素標品も前述のようにアルカリには溶ける筈である。そこで両標品 150 mg 宛を 7 ml の 0.05N 苛性ソーダに溶解、水を加えて 15 ml とした黄褐色透明液、それぞれ 5 ml について、反応液を pH 8.3 の透明のまま酵素活性を測つたが両区共に完全に不活性化された。従つて第 15 表に於ける“酸沈澱-b”の活性を認めなかつた事も pH の関係かとも思われる。

しかし何れにせよ之等酸処理によつて酵素活性の低下は免れ得ないようであつた。

#### 酵素の熱処理

酵素の活性は 60° で最も強く顕われたが一方熱による不活性化も起る事はホモゼネートについて求めた加熱不活性化曲線からも推定された。精製酵素標品 180 mg を pH 6.0 の 0.1M 磷酸緩衝液に溶かし 45 ml とする。各 5 ml をツンベルグ管に入れ所定の温度に一定

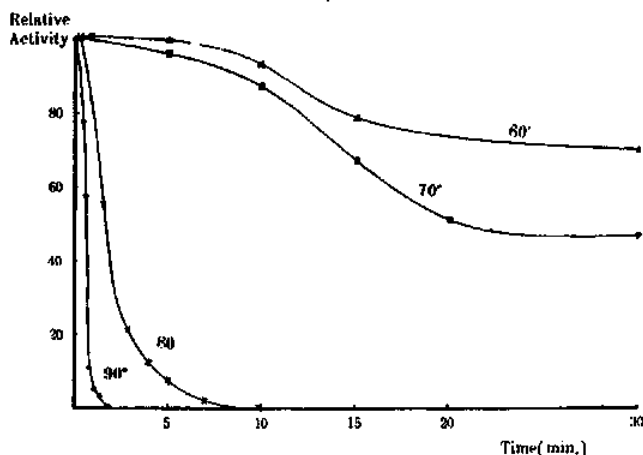


Fig. 8. Inactivation of enzyme by heating.

時間振盪しながら加温し直ちに一旦流水冷却後常法に従つて酵素活性を測定した。60°では3分乃至7分の間では濁濁、10分以上では沈澱を生じ、70°では1分で濁濁、5分迄は沈澱を生じて微濁、7分以上では沈澱を生じて液は透明となり、又80°以上では加温後直ちに凝集沈澱を生じた。第8図から明らかなように90°では約2分、80°では約10分で完全に失活したが70°では約50%、60°では約70%の活性が残存した。

加熱処理によつて蛋白が沈澱し液は完全に透明であつても尚酵素活性を示した。このことはpH 5.0附近での反応状況と類似している。そこで凝集沈澱及び残存上澄の酵素活性を求めた。酵素標品 180mg を 27ml 緩衝液に溶かし各 3ml を前回に従つて60°及び70°にそれぞれ10分間宛加熱処理、遠心分離して透明上澄と凝集沈澱とに分け後者を再び緩衝液に懸濁何れも 3ml に復して活性を測定した。

Table 17. Activity of heat-treated enzyme.

Temperature	Control	60					70				
		+	+	-	+	+*	+	+	-	+	+*
Supernatant		+	+	-	+	+*	+	+	-	+	+*
Precipitate		+	-	+	+*	+	+	-	+	+*	+
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	57.2	51.6	40.0	13.7	42.0	13.4	37.2	26.8	4.5	24.6	6.5

\*: boiled for 5 min. at 100°C prior to reaction. Control: not treated.

沈澱上澄共に酵素活性を示すが沈澱部は弱かつた。

両区分に分けられた酵素が酸の場合と同様キサンチン酸化酵素力を示すか否か、70°, 10分処理酵素について測定した結果を第18表に示す。

Table 18. Activity of nitrate reductase, xanthine oxidase and aldehyde oxidase of heat-treated enzyme.

Fraction	Original			Supernatant			Precipitate		
	Acetaldehyde	Xanthine	Hypoxanthine	Acetaldehyde	Xanthine	Hypoxanthine	Acetaldehyde	Xanthine	Hypoxanthine
NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M	78.0	29.2	17.6	26.0	16.8	7.3	8.0	5.2	2.6
Time of MB decoloration, min.	10	9	11	31	19	22	191	42	—

明らかに何れの酵素活性も両区分に分かれ且つ同様に沈澱区が弱い。

そこで酸処理の場合同様両区分の吸収スペクトルを測定した。酵素標品 100mg を pH 6.0 の 0.1M 磷酸緩衝液に溶かし 70°の温湯に 10分間浸漬した後遠沈上澄 10ml を分離する。沈澱を 1回緩衝液で洗滌した後 0.2N 苛性ソーダに溶解したが、酸処理の場合とは異なつてより濃厚なアリカリにも完全には溶けなかつたが、懸濁液のまま 10ml とした。この黄色透明上澄液と白濁沈澱懸濁液について可視部のスペクトルを測定し、それぞれ5倍稀釈して紫外部の吸収を求めた。第9図に示すように、上澄、沈澱両区分共に、350m $\mu$  に極めて僅かの凸起が現われたが、その外に沈澱区には 410乃至420m $\mu$  に明瞭な肩が認められるに過ぎず未処理酵素標品に顕著な 405m $\mu$  の吸収は消失した。之は加熱の影響であつて沈



澱区の肩がその名残だと思われる。之に対して紫外部では両区共特有の吸収を示した。即ち上澄では  $274\text{m}\mu$  に極大,  $252\text{m}\mu$  に極小値を持つのに対し沈澱区のスペクトルは  $284\text{m}\mu$  に極大,  $272\text{m}\mu$  に極小の曲線であつて、酸分別の場合と異なつてゐる。

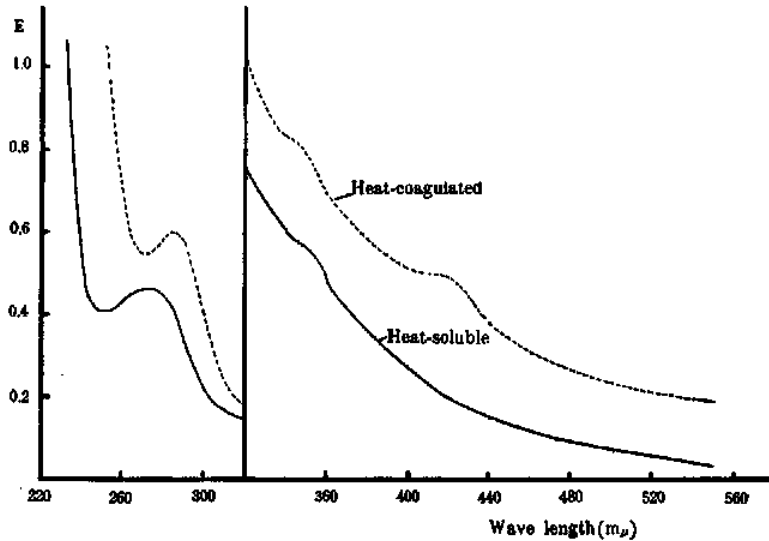


Fig. 9. Absorption spectra of heat-treated fractions.

之等の分割がそれぞれ別の酵素であるか否かは更に研究に俟たなければならないが、少なくとも肝臓の硝酸還元酵素は唯一種とは限定されないように思われる。

本研究に用いた費用の一部は文部省科学研究助成費によつた。

## 総 括

鶏肝硝酸還元酵素を牛肝酵素に倣つて精製し比較研究した。牛肝酵素同様に酵素作用にはアセトアルデヒドが必須であり  $\text{Fe}^{++}$  塩によつて賦活された。この事は硝酸還元酵素の本性に関するアルデヒド酸化酵素説を支持するようと思われるが異なつた肝臓から同一方法で調製した多くの標品の硝酸還元酵素とアルデヒド酸化酵素の活性は必ずしも平行しなかつた。

一方鶏肝酵素と牛肝酵素の性質に二、三の差異も観察された。粗酵素液並びに牛肝酵素と同様に pH 5.8 に反応の至適 pH があるが更に pH 4.5 附近にも第 2 のピークが見られた。又活性は牛肝より高温、 $60^\circ$  で最も強かつた。鶏肝酵素は特異的な吸収スペクトルも示した。即ち  $405\text{m}\mu$  に極大値を持つ事は牛肝同様であるが紫外部は  $250$  乃至  $280\text{m}\mu$  に亘り平坦であつて顕著なピークは認められなかつた。

酵素活性は  $\text{Fe}^{++}$  添加の有無に拘りなくアザイド、チオ尿素、オキシシン、EDTA、シアン、モノヨード醋酸、PCMB 及び銅塩等によつて阻害され金属及び SH 基の関与を示唆した。

アセトアルデヒドの代りに肝臓のフラビン抽出液、酵母から調製した粗 DPN 溶液及び肝臓のミトコンドリアも水素供与系として酵素に共働し得る。更に肝臓抽出液の透析性物質も硝酸還元酵素の直接水素供与体として作用し得る。透析外液を濃縮、4 フラクションに分けその何れもが基質効果を示したので肝臓組織には少なくとも4種の固有水素供与体が含まれると推定された。

上述のように酵素は酸性域でも活性であるが反応液は pH 5 附近で凝集沈澱を生じ透明となつた。この両フラクションについて硝酸還元酵素及びアルデヒド並びにキサンチン酸化酵素の活性が認められた。然も両者のスペクトルは全く異なつた。即ち 405 m $\mu$  の吸収は透明上澄に残るが沈澱部では消失し一方紫外部の平坦域は狭められたが沈澱部には残り透明上澄では 276 m $\mu$  に吸収極大が現われた。同様に例えば 60° 或いは 70° に 10 分間加温しても沈澱を生じ透明部と分けられた。この場合にも両者共に硝酸還元、アルデヒド及びキサンチン酸化の両酵素力を保持したが酸処理の場合とは逆に上澄の活性が沈澱のものよりも強かつた。又その吸収スペクトルは互に異なる上に酸処理で分けたものの吸収曲線とも異なつた。何れにしても硝酸還元酵素は唯一種に限定されるものではない事は明らかである。

## 文 献

- 1) 大村浩久, 1957. 九大農芸誌, 16: 225.
- 2) 大村浩久, 1954. 九大農芸誌, 14: 423.
- 3) 大村浩久, 1956. J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 10: 365.
- 4) 大村浩久, 1958. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 22: 387.
- 5) 大村浩久, 1958. 九大農芸誌, 16: 517.
- 6) 大村浩久, 1959. 九大農芸誌, 17: 197.
- 7) Dixon, M. and Thurlow, S., 1924. Biochem. J., 18: 989.
- 8) Bernheim, F. and Dixon, M., 1928. Biochem. J., 22: 125.
- 9) 大村浩久・高橋平八郎, 1959. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 23: 83.
- 10) 山田敏郎, 1953. 標準生化学実験. p. 342, 文光堂.
- 11) 江上不二夫・鈴木 旺・丹羽 允・佐藤 了, 1950. 日化, 71: 226.
- 12) Le Page, G. A., 1947. J. Biol. Chem., 168: 623.
- 13) Warburg, O. and Christian, W., 1936. Biochem. Z., 237: 291.
- 14) 大村浩久, 1959. Enzymologia, 20: 271.
- 15) 大村浩久, 1959. 農化, 33: 652.

## Summary

According to the procedure preparing the nitrate reductase of cattle liver, the fowl liver enzyme was partially purified from the homogenate by repeated fractionation with ammonium sulfate and following treatment with Ca-phosphate gel. This preparation was very soluble in water and buffer making a clear pale yellow solution and could be preserved for a considerably long time in cold when it was kept moist after removing water as far as possible by means of an aspirator. However, the enzyme was denatured and lost its solubility as well as activity, if it was further dried in vacuo.

As cattle liver enzyme, acetaldehyde was indispensable as a hydrogen donor for the enzymatic reduction of nitrate and the enhancement of the activity was provoked by some ferrous salts. Although this implies the rationality of the aldehyde oxidase hypothesis concerning the principle of the nitrate reductase, a proportionality between both activities of the nitrate reductase and the aldehyde oxidase could not be observed with many preparations which were prepared by the same procedure but from different livers. The final concentration of  $2 \times 10^{-3}M$  of nitrate and acetaldehyde was most suitable for the estimation of the activity. The direct relationship of the activity to the dose of the enzyme and the reaction time was also established. The reductase activity with and without ferrous ion was inhibited by  $NaN_3$ , thiourea, 8-hydroxyquinoline, EDTA, KCN, monoiod acetate, PCMB and Cu salts, which might suggest the participation of metal and SH group in the enzymatic nitrate reduction.

However, some of the properties of the fowl enzyme were different from those of cattle. There were two peaks in the pH-activity curve, at pH about 4.5 and about 5.8, though the later agreed with the optimum pH of the crude liver homogenate as well as that of the cattle liver enzyme. The reduction was carried out most actively at  $60^\circ C$  higher than the optimum temperature of the cattle enzyme. Furthermore, the reductase of the fowl liver exhibited a peculiar absorption spectrum which have a plateau from 250 to 280  $m\mu$ , contrary to that of cattle having a peak at 262  $m\mu$ . On the other hand, the spectra of both enzymes in a visible range were approximately similar to each other, presenting a maximum at 405  $m\mu$ .

In place of acetaldehyde, flavin fraction of liver, raw DPN solution from yeast, and mitochondria of liver could conjugate with the nitrate reductase of fowl liver as a hydrogen donating system. Moreover, dialisable substances of the liver extract could also function as an immediate substrate of the enzyme. Since the substances could be separated into 4 fractions and all these fractions had the ability to bring about the reduction of nitrate by the reductase, there might be at least 4 kinds of the inherent hydrogen donors in the liver tissue.

As described above, the nitrate reductase was active in the acid media too. However, the reaction mixture was clarified at pH 5.0 producing a coagulated deposit which became now almost insoluble in buffer of neutrality. Concerning both clear supernatant and suspension of precipitate, the activities of the aldehyde and xanthine oxidases as well as nitrate reductase could be established. The activity of the precipitate was higher than that of the supernatant, while pH-activity curves of both fractions were similar to each other and to that of the original enzyme; there were two optimum pHs. However, the absorption spectra

were quite different. The extinction at  $405\text{m}\mu$  was maintained in the spectrum of the supernatant but lost in that of the precipitate which had been dissolved in weak alkaline solution. On the contrary, the plateau in ultraviolet range remained in the later though it was narrowed, whereas it was lost but a peak at  $270\text{m}\mu$  was appeared in the former.

Similarly, the enzyme was divided into two fractions, the clear supernatant and the precipitate, by heating, for example at  $60^\circ$  or  $70^\circ\text{C}$  for 10 min. In this case too, both fractions had the activities of the nitrate reductase and the aldehyde and xanthine oxidases. However, the activities of the supernatant were higher than that of the precipitate, in opposition to the case of acid treatment. Furthermore, it was found that the absorption spectra of these fractions differ from one another. Hence, at any rate, it is supposed that there might be some kinds of enzymes which accompany both activities of the aldehyde and xanthine oxidases as well as nitrate reductase.