

?肝臓の硝酸還元酵素(IV) : 細胞内分布

大村, 浩久
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21493>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.225-231, 1959-12. 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 (IV)*

細胞内分布

大村 浩久

On the nitrate reductase of the fowl liver (IV)

Intracellular distribution
of the enzyme

Hirohisa Omura

廿日鼠¹⁾及び牛²⁾肝臓の硝酸還元酵素は可溶性蛋白質に属し主として細胞質部分に含まれているが、同時に組織固有の水素供与体その他の補助因子も同じく細胞液に溶存しているため硝酸塩の還元は細胞質に行われている事が推定された。更にミトコンドリアも水素伝達系として反応に関与し得る事が示されたがこの粒子の効果は動物或いは組織の種類による顕著な特異性は認められなかつた。一方従来行つてきた肝臓の硝酸還元酵素に関する研究からホモゼネートでの硝酸還元或いは精製実験に於て多少の差は認められるが本質的には殆ど相違がない事は明らかであつて、その細胞内挙動についても非常に類似している事が推定される。

実 験

硝酸還元は常法に従つて測定しその活性は生成した亜硝酸の反応液中の濃度で表わした。

細胞核の活性

従来の研究に用いた粗酵素液は新鮮肝臓を 0.067M 磷酸緩衝液に磨碎懸濁し 3000r. p. m. で 10 分間遠心分離した上層ホモゼネートであつて組織片等の外に細胞核も沈降する可能性を示すがこの沈降部にも或る程度の活性が認められる事は雞³⁾及び廿日鼠の肝臓⁴⁾で観察した。

そこで Mirsky 及び Pollister⁵⁾の枸橼酸抽出法によつて廿日鼠の場合に倣つて細胞核を分離した。市販雞肝新鮮組織 5g を Warling ブレンダーで 1% 枸橼酸溶液に磨碎懸濁し 35ml として綿布濾過後 3000r.p.m. で 10 分間遠心分離する。沈殿を再び 1% 枸橼酸 35ml にブレンダーで均一に懸濁し二重綿布濾液を 5 分間遠沈、次に 0.2% 枸橼酸 35ml に懸濁、三重に折疊んだ綿布で濾過した後 1500r.p.m. の低速で 5 分間遠心分離した。同様に 0.2% 枸橼酸で更に 3 回洗滌した後 0.14M NaCl-0.01M 磷酸緩衝液を用い pH 6.8 で 4 回洗滌した。こうして殆ど均一の肝臓細胞核が分離出来たがこれを pH 6.0 の 0.067M 磷酸緩衝液に懸濁して活性の測定に用いた。分離操作は総て氷冷下に行い分離後直ちに試験した。試験には原組織 0.5g に相当する核懸濁液 5ml 宛を酵素液として用い、適当な水素供与体を加え 40° 2 時間 0.01M 硝酸ソーダ溶液中で反応させた。

* 硝酸還元酵素に関する研究、第 16 報。

Table 1. Nitrate reduction with cell nuclei.

H-donator, 10 ⁻² M	None	Acetaldehyde	Succinate	Glutamate	Citrate
NO ₂ formed, μM	0.8	0.7	0.9	0.8	0.7

透析ホモゼネートでの還元力恢復に有効な種々の水素供与体を加えても殆ど酵素力を認める事は出来なかつた。

細胞核を分離する方法については本法は二、三の研究者⁹⁾によつて批判されているが、彼等が推奨する CaCl₂ を含む 0.34 M 蔗糖溶液を用うる方法はミトコンドリアの混入を免れ得ない。他方 Dounce 等⁷⁾は枸橼酸法で分離した核について研究を行つている。何れにせよ少なくとも本法によつて分離した細胞核には廿日鼠肝臓の場合同様硝酸還元酵素の活性は検出されない。

組織等張分割成分の酵素力

酵素の性質測定に用いたホモゼネートは着色不透明であつて遠沈力から考慮し細胞内粒子をも含むと思われる。廿日鼠或は牛肝臓と同様に Schneider⁸⁾の方法に倣つて等張蔗糖溶液を用い分別遠心分離法で細胞内成分を分別した。操作は総て前回同様であるが、遠心力は使用した久保田 KR6-B 型高速度冷凍遠心沈澱機の回転計目盛から便宜上多少変更し原報で用いられた重力に近い回転数を用いた。

雞肝 5g を Elvehjem 型硝子ホモゲナイザーで小モーターを用いて 0.25 M 蔗糖溶液に磨碎懸濁 40ml とし 2000 r.p.m. 10 分間遠心分離して組織片、未破壊細胞、細胞核、血球等を除く。上層液を 40ml とし“上澄 A”とする。次いでその 32ml を 10000 r.p.m. で 10 分間遠心分離してミトコンドリアを沈降、上澄を再び 32ml に戻し“上澄 B”とする。ミトコンドリアを再び蔗糖に懸濁洗滌遠沈した後 8ml の粒子懸濁液とする。最後に“上澄 B” 24ml を 15000 r.p.m. で 60 分間遠心分離してマイクロゾームを沈澱し終局的に透明な抽出液“上澄 C”区が得られる。マイクロゾームもミトコンドリアに倣つて 6ml 蔗糖懸濁液とする。分離後直ちに原組織 0.5g に相当する量即ち“上澄 A,” “上澄 B,” “上澄 C”各 4ml, 両粒子区 1ml 宛を用いて酵素活性を測定した。尚反応液の pH は 6.0 であつて反応液の磷酸緩衝液濃度 0.03M とした。その結果を第 2 表に示す。

Table 2. Nitrate reduction with isotonic fractions.

Fraction	SupA	SupB	Mit	Mic	SupC	SupB + Mit	Mit + Mic	Mic + Mit + SupC	Mic + SupC	Mit + SupC	SupC + AA	SupA + AA
Total-N, mg			4.76	4.56	16.62							
NO ₂ formed, μM	19.1	20.1	1.9	1.2	18.2	20.6	2.7	20.3	18.9	19.6	20.6	15.9

SupA: Supernatant after centrifugation of original homogenate at 2000 r.p.m. for 10 min.

SupB: Supernatant after centrifugation of SupA at 10000 r.p.m. for 10 min.

Mit: Precipitate by above treatment.

SupC: Supernatant after centrifugation of SupB at 15000 r.p.m. for 60 min.

Mic: Precipitate by above treatment.

AA: Acetaldehyde in final concentration of 10⁻²M.

All fractions used correspond to 0.5g fresh tissues.

酵素活性は廿日鼠 或いは牛の場合と同様に主として細胞質に含まれて居り両粒子区では極めて微弱にしか検出されない。“上澄B”に於て“上澄A”よりも強く現われ又アセトアルデヒドの効果が認められない点に於て牛の場合と異なるがこの事は 固有基質を含んだホモゼネートでの観察と一致する。併し一般的に各区の活性の和及び各区再混合液の活性は原区の活性に概略等しくなる傾向を示す。例えば“上澄B”の活性は“上澄C”と“マイクロゾーム”両区の活性の和或いは両区混合液の活性に略々一致した。唯この場合組織に含まれている固有水素供与体は各遠沈上層部にはあるが両粒子区には殆ど欠いているために酵素活性を示さない事も考えられた。事実は分離したミトコンドリア懸濁液がホモゼネートの硝酸還元を促進した種々の水素供与体と共存すれば顕著な脱水素酵素力を示す事は既に報告したが更に粒子自身硝酸還元酵素の水素供与系として有効な事を哺乳動物ならびに雞肝臓について確めた。^{4,9,10} 併し第2表の結果からは明白には認められない。これは廿日鼠でも観察した所であつて組織固有基質が共存して反応に優先しミトコンドリアの効果を抑えるためである事が認められた。

そこで代表的水素供与体のミトコンドリアに対する影響及び之等と“上澄C”との相互作用を測定した。雞肝 10g から 20ml のミトコンドリア懸濁液及び 100ml の“上澄C”を調製しそれぞれ原組織 0.5g に相当する前者 1ml, 後者 5ml を用い更に反応液中終濃度 0.01M になるように水素供与体を加えて作用させた。この結果を第3表試験1に示す。

Table 3. Effect of mitochondria on nitrate reduction with "SupC" fraction.

H-donator, 10 ⁻² M		None		Succinate		Citrate		Glutamate		Acetaldehyde						
Mitochondria		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-			
Sup C		+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+			
NO ₂ formed, μM	Test 1.	10.0	0.8	9.1	9.6	0.8	9.6	9.7	0.8	9.6	9.7	0.8	9.3	10.0	0.8	9.8
	Test 2.	14.9	0.8	5.5	19.4	0.8	6.3	15.6	0.8	5.8	21.0	0.8	5.8	49.5	0.8	46.0

In Test 1, the original supernatant was employed, and in Test 2, the dialysed supernatant which had been dialysed against running water for 22 hrs. and centrifuged again at 9000 r. p. m. for 10 min. was used.

ミトコンドリア自身水素供与体を加えても単独では殆ど硝酸塩を還元しない。又ミトコンドリアの“上澄C”酵素に対する促進作用も基質の有無に拘らず認められなかつた。然も最も有効な基質であるアセトアルデヒドでも無効な点牛肝臓の場合と異なるがホモゼネートでの観察と一致する。廿日鼠の場合若しくはホモゼネートで屢々経験したように透析すれば水素供与体の効果が顕われる事実に鑑み“上澄C”を22時間流水透析し生成した沈澱を9000 r.p.m. で10分遠沈除去し透明な上澄液に対しミトコンドリア及び水素供与体を加えた反応系による生成亜硝酸量を同じく試験2に示す。予想したようにミトコンドリアの著しい効果が確認された外琥珀酸、枸橼酸、グルタミン酸等による促進作用が認められた。更に“上澄C”の透析による活性低下は当然であるが透析液単独による硝酸還元はアセトアルデヒドを除く水素供与体を加えても影響されないようである事は第4表からも推定される。

Table 4. Effect of some substances on dialysed "Sup C" fraction.

H-donor, 10 ⁻³ M	None	Glutamate	Citrate	Succinate	Malate	Maleate	Tartarate	Glucose	Acet- aldehyde
NO ₂ formed, μM	1.6	2.0	1.4	2.0	2.1	1.9	1.5	1.8	8.4

之等の物質はホモゼネートの硝酸還元促進には有効であるので、この作用にはミトコンドリアの仲介を必要とする事は明白であるが、アセトアルデヒドだけは直接水素供与体として作用し得ること等哺乳動物の肝臓酵素と全く差異は認められないし、前報¹⁾記載の精製酵素での実験結果とも合致する。

ホモゼネートの場合と共に“上澄C”でもアルデヒドの作用は抑制されて居り透析すれば顕著な促進作用を示すようになるが次の試験もこれを示唆する。雞肝 20g から常法通り 15000 r. p. m. で 1 時間遠心分離して上澄液 100 ml を調製、その 70 ml を 1 l の蒸溜水に対して約 3°C の氷室内で 1 日透析して“透析上澄液”とする。一方透析外液を減圧濃縮して 7 ml としその 1 ml を透析液に加えて活性を測定した。尚牛肝透析外液も同様に調製して比較のために用いたが、第 5 表に示すように透析による活性の低下、透析外液による恢復等常法通りに観察されるが更にアルデヒドの促進作用も透析液及び牛肝透析外液を加えた時には認められるが雞肝外液では認められなかつた。尚上澄液透析後若干の沈澱が析出し之を遠沈除去して試験に用いたが、一方この沈澱を 10 ml の緩衝液に溶解その 5 ml についての活性をも同時に示す。

このように酵素は上澄液に含まれている事は明白であるがその吸収スペクトルも精製酵素のものと酷似していて、他方ミトコンドリア及びマイクログゾームの吸収曲線は全く異な

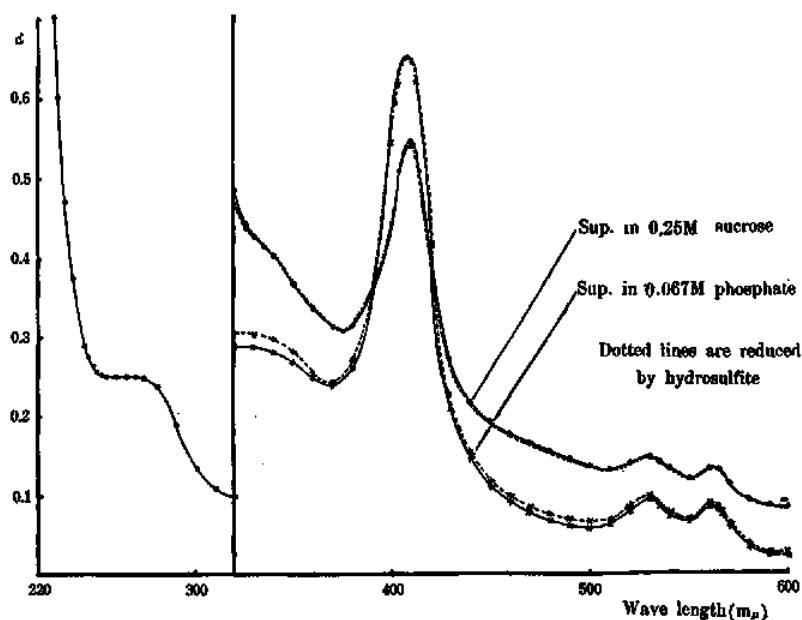


Fig. 1. Absorption spectrum of the supernatant fraction.

Table 5. Effect of dialysate.

Enzyme	"Sup C"		Dialysed "Sup C"				Precipitate		
	None		None		Fowl liver			Cattle liver	
Dialysate	None		None		Fowl liver		Cattle liver		None
Acetaldehyde, $2 \times 10^{-2} M$	-	+	-	+	-	+	-	+	+
NO ₂ formed, μM	9.6	9.6	4.3	6.5	8.7	8.7	9.0	10.1	6.7

ついている事を既に廿日鼠及び牛の肝臓について確めた。雞肝臓についても例外ではない事は第1図及び第2図のスペクトルから明らかである。

雞肝臓 2g を 0.25M 蔗糖溶液で常法通り抽出，その2倍稀釈液について可視部，100倍稀釈液について紫外部の吸収を測定した。又同じく 2g を pH 6.0 の 0.067 M 磷酸緩衝液で磨碎抽出して得た 10ml 透明溶液を 20 倍稀釈して可視スペクトルを求め第1図に記載した。この両抽出上澄液をそれぞれ一晩流水透析し遠心分離後同様に 2 倍及び 20 倍稀釈液についてのスペクトルを第2図に示した。尚還元型は何れもヘイドロサルファイトで常法通りに還元したものである。

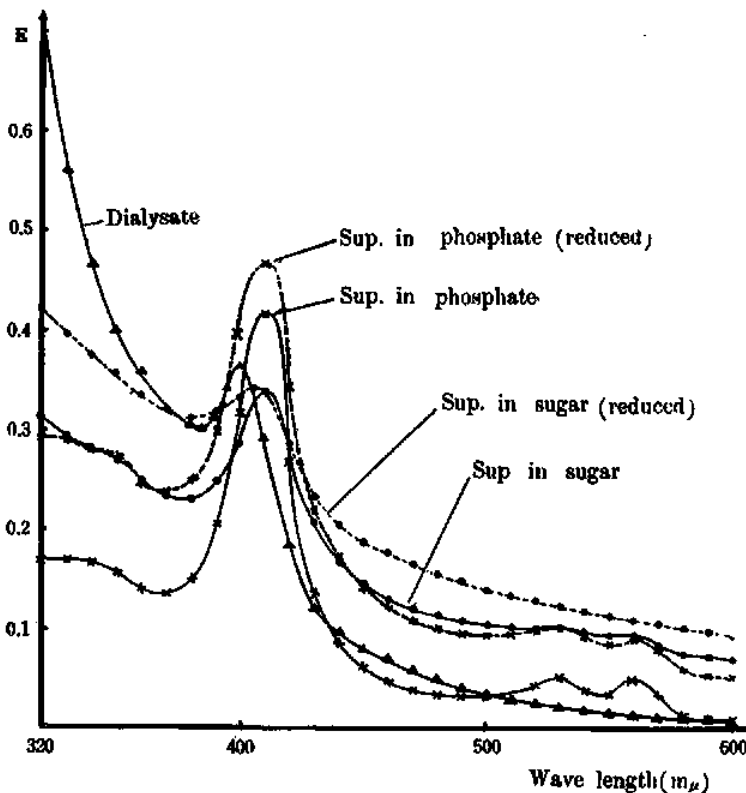


Fig. 2. Absorption spectra of the dialysed supernatant fraction and dialysate.

“上澄C”の吸収が紫外部に於て 250 m μ 附近から 275 m μ にかけて平坦面を持つ事及び 410 m μ に顕著な吸収極大がある点に於て精製酵素のものと同じであるが更に 530 及び 562 m μ にも吸収がある点迄予期したように廿日鼠、牛等哺乳動物の肝臓と同様である。透析によつて吸光度が全般に亘つて減少する事も等しく観察されたが、530 及び 560 m μ の吸収は辛じて認められる程度に痕跡を残し完全に消失した廿日鼠、かなり顕著に残つた牛との略々中間の状態を示した。磷酸緩衝液で抽出すると蔗糖に比べて赤色の強い透明液が得られ吸光度は極めて大きく略々 10 倍にも達した。しかしスペクトルそのものは全く同様であつて可視部 3 吸収の位置も一致したが 410 m μ の主吸収の高さが更に高く蔗糖では不明瞭であつた 410 m μ と 530 m μ の両吸収間の底部が 500 m μ にはつきりと観察された。その上透析しても 530 及び 560 m μ の両吸収がかなり明瞭に残つた。

之に対して還元型では原上澄液は蔗糖、緩衝液共に変化なかつたが透析液では多少の變化が認められた。即ち蔗糖の場合、吸収は全般に増加したが 410 m μ の極大吸収度は殆ど変化しないため所謂吸収の山が低くなつた。又極大値も牛の場合とは逆に多少短波長側に移動して 405 m μ に認められた。更に痕跡を留めていた長波長側の両吸収は完全に消失した。磷酸塩の場合も吸収度の増加、410 m μ の極大吸収と 370 m μ の極小吸収値の比、所謂山の高さの減少及び 530, 560 m μ の両吸収の不明瞭化と何れも蔗糖の場合と同じ傾向を示した。尚透析外液濃縮液では 400 m μ に極大、384 m μ に極小のスペクトルが観察された。

このような“上澄C”のスペクトルが精製酵素のものに酷似する事はこのフラクションに酵素が含まれる実験結果を支持するものである。更に之等の曲線が廿日鼠、牛のものと同じである事も酵素の性質の類似性と併せて興味深いが、特に精製酵素には認められない長波長側の吸収には動物によつてそれぞれ特異的な面があり肝臓組織の特徴を示すものとも思われる。410 m μ の吸収は血色素に関係するものもこの位置に吸収があり、磷酸抽出液で特に顕著な吸光度が認められる点或いは酸処理精製酵素では認められなくても活性を示す事、更に廿日鼠で 410 m μ の吸収を持たない活性酵素標品が得られた事等から酵素蛋白と関係があるか否かには疑問が残る。

本研究費の一部は文部省科学研究助成費によつたものである。

総 括

雞肝臓の硝酸還元酵素も廿日鼠及び牛の肝臓酵素と同様に細胞質部に溶存しているが、細胞核、ミトコンドリア、マイクロゾーム等細胞内粒子には認められなかつた。しかしミトコンドリアの酵素系は水素伝達体として種々の基質と硝酸還元酵素間を仲介し得る事が認められ、先に観察したホモゼネート硝酸還元之等物質による促進作用はミトコンドリアの作用に基く事が推定された。

細胞抽出液の吸収スペクトルについても廿日鼠及び牛のものと極めて似ている事を認めたが、二、三組織特有の性質も観察した。

文 献

- 1) 大村浩久, 1959. *Enzymologia*, **20**: 271.
- 2) 大村浩久, 1959. *農化*, **33**: 652.
- 3) 大村浩久, 1957. *九大農学芸誌*, **16**: 225.
- 4) 大村浩久, 1954. *九大農学芸誌*, **14**: 423.
- 5) Mirsky, A. E. and Pollister, A. W., 1946. *J. Gen. Physiol.*, **30**: 117.
- 6) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. and Striebich, M.J., 1952. *J. Biol. Chem.*, **196**: 111.
- 7) Dounce, A. L., 1950. *Ann. New York Acad. Sc.*, **50**: 982.
- 8) Schneider, W. C., 1948. *J. Biol. Chem.*, **176**: 259.
- 9) 大村浩久・高橋平八郎, 1959. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**: 83.
- 10) 大村浩久, 1959. *九大農学芸誌*, **17**: 205.

Summary

The activity of the nitrate reductase could not be detected in the nuclei which had been isolated from the fowl liver by the citric acid method.

Then the liver was fractionated with the isotonic sucrose solution by the differential centrifuge method and the intracellular distribution of the nitrate reductase was surveyed by estimating the activity of the mitochondrial, microsomal and supernatant fractions. It was found that most of the activity was contained in the supernatant, while it was scarcely detected in the former two particles. Since native hydrogen donors were dissolved in cell sap, it was suggested that the nitrate reduction can be performed within the cytoplasm of the liver cell. However, the mitochondria could mediate transfer of hydrogen between some donors and the nitrate reductase.

The absorption spectrum of the supernatant fraction was estimated and found to be very similar to that of the purified preparation. The former, however, have two more feeble peaks at 530 and 562 $m\mu$, which were extinguished by dialysis.

These observations agreed well with those concerning the livers of mouse and cattle.