

## 鶏肝臓の硝酸還元酵素(V) : 亜硝酸の減少

大村, 浩久  
九州大学農学部

井田, 明  
九州大学農学部

松口, 龍彦  
農業技術研究所土壌第一科

<https://doi.org/10.15017/21494>

---

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 17 (3), pp.233-239, 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 (V)\*

### 亜硝酸の減少

大村浩久・井田 明・松口龍彦†

On the nitrate reductase of the fowl liver (V)  
Decrease of nitrite

Hirohisa Omura, Akira Ida and  
Tatsuhiko Matsuguchi

生物の硝酸還元力は一般にその還元生成物である亜硝酸の生成量で測定されているが、若し亜硝酸が引続いて作用を受けるならば亜硝酸の量で活性を示す事は好ましくない。事実は緑藻<sup>4)</sup> や牛の脾臓<sup>5)</sup> によつて硝酸の還元と共に亜硝酸の減少が起る事を認めたが、更に或る種の微生物<sup>10)</sup> や植物<sup>9)</sup> に亜硝酸及びヒドロキシルアミン還元酵素の存在が証明されている。そこで硝酸還元力を測定する場合には同じ条件で亜硝酸が減少するか否かを予め確かめなければならない。我々は種々の動物の肝臓酵素について比較研究を行つてきたが、少なくとも肝臓酵素に於ては従来の測定条件では亜硝酸の減少は殆ど認められないか又は極めて僅かであつた。唯鶏肝臓のホモゼネートの場合<sup>3)</sup> 個体によつては無視出来ない程度に減少する事もあつたが精製標品<sup>6)</sup> では全く認められなかつた。従つて少なくとも肝臓の精製酵素を用いる限り上記危惧を考慮する必要はないと思われ一応亜硝酸は作用されない事が示唆されるが、オキシム代謝に関する我々の経験から亜硝酸還元酵素が存在しないと断定する事は躊躇される。即ち植物だけでなく肝臓、心臓、腎臓等の動物組織にもオキシム化合物が含まれているが、<sup>12)</sup> 更に家蚕組織<sup>13)</sup> や廿日鼠内臓<sup>15)</sup> のオキシム含量が亜硝酸塩の投与によつて増加する事も認められた。これは亜硝酸がヒドロキシルアミンに還元され、呼吸等の反応によつて生成されるカルボニル化合物と結合してオキシムが生成されると考えられるが、又之等の組織にオキシマーゼ<sup>14)</sup> 及びトランスオキシマーゼ<sup>16)</sup> が発見されアミノ酸生成の新しい経路が推定された。<sup>17,18)</sup> 他方グルタミン酸、アスパラギン酸等とヒドロキシルアミンとからヒドロキサム酸を経由してグルタミン及びアスパラギンが生成される事も知られている。<sup>9)</sup> 之等は肝臓をも含めて動物組織にもヒドロキシルアミンが生ずる可能性を示すものであつて亜硝酸還元反応が起り得る事を推定させる。

別に我々は酵母から分離した DPN 標品或いは肝臓から抽出したフラビン溶液が精製酵素の水素供与体として有効であつてアセトアルデヒドに代り得る事を報告した。<sup>9)</sup> 特に後者の場合亜硝酸生成量の最大値を得るためには添加するフラビンに適量があつてこれよりも多いと却て亜硝酸の生成量は減少する事を経験した。若しフラビン類が水素供与体或いは

\* 硝酸還元酵素に関する研究、第 19 報。

† 現勤務先：農業技術研究所土壤第一科。

中間伝達体として硝酸還元系にだけ有効であるならば、フラビン量の増加に伴つて亜硝酸の生成量も増加するか或る一定値に達すると思われ減少する事は考えられない。これは牛脾臓に於て酵素の量を増すと亜硝酸の生成量が却て減少する事と似ているので更に之等の点について検討した。

## 実 験

### 1. 硝酸還元に対する FAD の影響

肝臓からのフラビン抽出液が水素供与体として極めて有効な事は既に報告した通りであるが、使用したフラビン溶液中の FAD の含量は非常に少なく多くの不純物を含む事が推定される。一方肝臓組織中には種々の有効な水素供与体も含まれている。従つて使用したフラビン溶液の水素供与能はこの夾雑物の効果であつてフラビン自体の作用ではないとも考えられるので改めて FAD の影響を試験した。酵素標品、DPN の調製及び硝酸還元力の測定は前報<sup>9)</sup>に従い FAD は市販純品（ワカモト製薬、純度 90% 以上）を用いた。

Table 1. Effect of DPN and FAD on the enzymatic reduction of nitrate.

| Thunberg tube                   |                               | 1   | 2    | 3   | 4   | 5    | 6    | 7   |
|---------------------------------|-------------------------------|-----|------|-----|-----|------|------|-----|
| Main                            | Enzyme (10 mg/ml), ml         | 5   | 5    | 5   | 5   | 5    | 5    | 5   |
|                                 | FAD (50 $\gamma$ /ml), ml     | 1   | —    | 1   | —   | 1    | —    | 1   |
|                                 | DPN (0.5 mg/ml), ml           | 1   | 1    | —   | —   | 1    | 1    | —   |
|                                 | H <sub>2</sub> O, ml          | —   | 1    | 1   | 2   | —    | 1    | 1   |
| Side                            | NaNO <sub>3</sub> (0.2 M), ml | 1   | 1    | 1   | 1   | 1    | 1    | 1   |
|                                 | Acetaldehyde (0.2 M), ml      | 1   | 1    | 1   | 1   | —    | —    | —   |
|                                 | H <sub>2</sub> O, ml          | 1   | 1    | 1   | 1   | 2    | 2    | 2   |
| NO <sub>2</sub> formed, $\mu$ M |                               | 9.7 | 13.3 | 5.1 | 6.1 | 10.4 | 12.8 | 5.9 |

40°C, 120 min., pH 6.0, anaerobic.

第1表の結果は前報に用いた肝臓からの抽出フラビン溶液での結果を裏付けるものであつて FAD も微弱ながら水素供与体として有効である事を示す。アセトアルデヒドは代表的な水素供与体であるが DPN を加へても殆ど促進作用を示さなかつた。更に最も特異的なものは FAD であつて、アルデヒド或いは DPN 区に加えると却て亜硝酸を減少し、先に述べたフラビン量の増加に伴い亜硝酸の量が減少する事実とも符合した。この事は FAD が酵素反応を抑制するか、牛脾臓のように亜硝酸が引続いて反応を受けるようになるか又は亜硝酸の測定が FAD によつて阻害されるためと考えられる。この中酵素阻害は FAD 単独で酵素反応が惹き起される事から殆ど考えられない。

### 2. 亜硝酸の比色定量に及ぼす FAD の影響

FAD 添加区に於ける亜硝酸量の低下を追究するために先ず検討する事は亜硝酸の比色定量を FAD が妨害するか否かという事である。これは一般に種々の化学薬品の影響を試験する場合常に注意しなければならない点であつて、若し亜硝酸の呈色が抑制されると外見的に酵素阻害が起つているように見える。そこでそれぞれの量の FAD を含む 10  $\mu$ M 亜硝酸ソーダ溶液を常法通りグリーンス試薬で発色させ定量した。

Table 2. Effect of FAD on the coloration of nitrite.

| FAD added, $\gamma$                | 50     | 25   | 10   | 5    | 1    | 0.5  | 0.1  | 0    |      |
|------------------------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| NO <sub>2</sub> estimated, $\mu$ M | Test 1 | 9.24 | 9.35 | 9.59 | 9.78 | 9.90 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
|                                    | Test 2 | 9.29 | 9.39 | 9.59 | 9.69 | 9.89 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |

Test 1: NO<sub>2</sub> containing FAD was colored with Griess's reagent as usual.

Test 2: NO<sub>2</sub> containing FAD was colored as Test 1 after heating at 100°C for 5 min.

第2表に於て FAD の添加量の増加に伴つて多少呈色度を減少する傾向が認められた。しかしその程度は低く 50 $\gamma$  で呈色阻害は約7%に過ぎない。FAD の添加によつて溶液は黄色を呈するため色調の変化が起り光電比色計による吸光度の減少を来すためと考えられる。又酵素試験では 100° に 5 分間加熱して反応を停止する。この加熱処理によつて FAD と亜硝酸との純化学的反應が起つて亜硝酸の分解が起る事も考えられるので上記組成の溶液を加熱し冷却後発色させた。試験 2 に示すその測定値から加熱処理は先づ問題がない事は明らかである。

### 3. FAD 添加による亜硝酸の酵素的減少

FAD が亜硝酸の呈色阻害或いは分解を起さない事が明らかになつたので FAD の添加による亜硝酸の減少は牛の脾臓と同様に酵素作用によるものと推定される。

そこで硝酸還元作用にならつて亜硝酸の減少を測定した。ツンベルグ管主室に酵素液、FAD 及び DPN, 副室に亜硝酸ソーダ及びアセトアルデヒドを入れ、脱気後混合して 40° 2 時間反応させ常法通り亜硝酸を測定した。対照として反応 0 時間のものも求め亜硝酸減少の比較基準とした。

第3表試験 1 に示すようにアセトアルデヒド、DPN, 或いはこの両者を同時に加えた場合僅かの亜硝酸減少が認められたが FAD 単独のものによる減少は顕著であり更にアルデヒド或いは DPN を追加すると多少促進された。試験 2 は 3 時間流水透析した酵素での結果であつて同様の傾向を示したが DPN 及びアルデヒドによる減少度は低下し逆に FAD に

Table 3. Decrease of nitrite by liver enzyme.

| Thunberg tube               |   | 1    | 2    | 3    | 4   | 5    | 6    | 7    | 8 |
|-----------------------------|---|------|------|------|-----|------|------|------|---|
| Main                        | Enzyme (10 mg/ml), ml                                 | 6    | 6    | 6    | 6   | 6    | 6    | 6    | 6 |
|                             | FAD (50 $\gamma$ /ml), ml                             | 1    | —    | 1    | —   | 1    | —    | 1    | — |
|                             | DPN (0.5 mg/ml), ml                                   | 1    | 1    | —    | —   | 1    | 1    | —    | — |
|                             | H <sub>2</sub> O, ml                                  | —    | 1    | 1    | 2   | —    | 1    | 1    | 2 |
| Side                        | NaNO <sub>2</sub> (5 $\times$ 10 <sup>-4</sup> M), ml | 1    | 1    | 1    | 1   | 1    | 1    | 1    | 1 |
|                             | Acetaldehyde (0.2M), ml                               | 1    | 1    | 1    | 1   | —    | —    | —    | — |
|                             | H <sub>2</sub> O, ml                                  | —    | —    | —    | —   | 1    | 1    | 1    | 1 |
| NO <sub>2</sub> decrease, % | Test 1  | 24.2 | 12.1 | 21.2 | 5.2 | 20.8 | 11.0 | 18.2 | 0 |
|                             | Test 2  | 56.7 | 9.1  | 55.5 | 8.5 | 51.2 | 7.9  | 31.1 | 0 |

Test 1: Normal enzyme was used.

Test 2: Enzyme which had been dialysed against running tap water for 3 hrs. was used.

40°C, 120 min., pH 6.0, anaerobic.

よるものは著しく高められた。之等の結果は FAD が亜硝酸の減少に特に重要な役割を占めている事を明らかに示すものであつてアルデヒド及び DPN の影響は殆ど認められない。亜硝酸の減少と酵素量との関係を第 4 表、反応時間との関係を第 5 表に示す。

Table 4. Effect of amounts of enzyme on the decrease of nitrite.

| Enzyme, mg                  | 25   | 50   | 75   | 100  | 200  |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|
| NO <sub>2</sub> decrease, % | 41.1 | 46.6 | 48.5 | 60.1 | 71.2 |

5×10<sup>-5</sup>M NO<sub>2</sub>, FAD 50γ, 40°C, 120 min., pH 6.0, anaerobic.

Table 5. Effect of reaction time on the decrease of nitrite.

| Reaction time, min.         | 15  | 30   | 45   | 60   | 120  |
|-----------------------------|-----|------|------|------|------|
| NO <sub>2</sub> decrease, % | 3.2 | 11.9 | 19.0 | 21.3 | 24.8 |

5×10<sup>-5</sup>M NO<sub>2</sub>, FAD 50γ, Enzyme 50 mg, 40°C, pH 6.0, anaerobic.

之等の実験は第 3 表のものと同じく 5×10<sup>-5</sup>M 亜硝酸ソーダに対し 50γ FAD を加えた酵素液を 40' で嫌氣的に作用させたものであるが、一応酵素量若しくは反応時間の増加と共に亜硝酸の減少を増加する傾向が認められた。

次に FAD の添加量を増すに従つて亜硝酸の減少量も増加する事が第 6 表に示す様に認められた。

Table 6. Effect of amounts of FAD on the decrease of nitrite.

| FAD added, γ                | 10  | 30  | 50  | 100  | 200  |
|-----------------------------|-----|-----|-----|------|------|
| NO <sub>2</sub> decrease, % | 1.9 | 3.8 | 7.7 | 23.1 | 50.0 |

5×10<sup>-5</sup>M NO<sub>2</sub>, Enzyme 50 mg, 40°C, 30 min., pH 6.0, anaerobic.

この場合反応条件は同一であるが作用時間は 30 分とした。FAD 100 及び 200γ で特に顕著な減少が認められているが、比較基準として FAD 50γ のものを用いたため第 2 表から推定されるように FAD の増加による亜硝酸測定値の低下が無視出来なくなつた事も附加されると考えられる。

硝酸還元酵素作用は空気によつて完全に阻止されるためツンベルグ管を用いて嫌氣的に活性を測定しなければならない。亜硝酸の減少も同様に嫌氣的に行われる事は第 7 表に明らかである。

Table 7. Effect of air on the decrease of nitrite.

| Condition                   | aerobic | anaerobic |
|-----------------------------|---------|-----------|
| Reaction time, min.         | 45      | 30        |
| NO <sub>2</sub> decrease, % | 3.2     | 16.8      |

5×10<sup>-5</sup>M NO<sub>2</sub>, FAD 50γ, Enzyme 50 mg, 40°C, pH 6.0.

硝酸還元酵素の最適温度は 55° 乃至 60° の比較的高温にある。亜硝酸の減少も第 8 表に示すように 50° とかなり高温で最も強い事が認められた。

Table 8. Effect of reaction temperature on the decrease of nitrite.

| Reaction temperature, °C              | 40   | 50   | 60   | 70   |
|---------------------------------------|------|------|------|------|
| NO <sub>2</sub> decrease, % { 60 min. | 14.4 | 20.8 | 9.4  | 7.8  |
| 120 min.                              | 20.6 | 26.1 | 15.4 | 11.1 |

5×10<sup>-3</sup>M NO<sub>2</sub>, FAD 50γ, Enzyme 50 mg, pH 6.0, anaerobic.

これ迄の測定は終濃度 M/30, pH 6.0 の磷酸緩衝液中で行つた。第 9 表は同一濃度の磷酸緩衝液、第 10 表は醋酸緩衝液を用い種々の pH での亜硝酸減少を示す。

Table 9. Enzymatic decrease of nitrite in phosphate buffer.

| pH of reaction mixture      | 7.7  | 7.4  | 7.0  | 6.7  | 6.3  | 6.0  |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|
| NO <sub>2</sub> decrease, % | 18.9 | 26.1 | 61.7 | 71.7 | 74.4 | 84.4 |

5×10<sup>-3</sup>M NO<sub>2</sub>, FAD 50γ, Enzyme 100 mg, 40°C, 120 min., anaerobic.

Table 10. Enzymatic decrease of nitrite in acetate buffer.

| pH of reaction mixture      | 5.7  | 5.4  | 5.0  | 4.6  | 4.2  | 3.9  |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|
| NO <sub>2</sub> decrease, % | 36.1 | 31.7 | 30.0 | 24.4 | 19.4 | 14.4 |

5×10<sup>-3</sup>M NO<sub>2</sub>, FAD 50γ, Enzyme 100 mg, 40°C, 120 min., anaerobic.

この場合第 10 表の実験は第 9 表に用いた酵素標品と同一のものではあるが 2 日間冷蔵したものを使用した。冷蔵による酵素活性の低下も認められるが更に醋酸緩衝液に於て磷酸塩に於けるよりも活性が弱いと思われる。何れにしても亜硝酸減少の pH 依存性も明らかであつてその至適 pH は 6.0 附近にあり硝酸還元酵素の第 1 のピークと一致する。

## 考 察

之等の結果から亜硝酸の減少が酵素作用による事は明白である。勿論之が還元酵素である事は牛脾臓の場合にも指摘したように反応生成物を確認しなければ結論出来ない。しかし FAD を加えなければ反応が起らない事、硝酸還元と同様に嫌氣的条件下のみ反応が進行する事、更にその至適 pH 及び温度も硝酸還元酵素のものに類似している事等から亜硝酸の酵素的還元が行われるものと推定される。

硝酸塩がアルデヒド乃至キサンテン酸化酵素の水素受容体として作用する事によつて還元が行われると古くから主張されてきた。<sup>1,2)</sup> 我々はこの事実は再考を要する多くの実験結果を得たがその重要性を否定する事は出来なかつた。<sup>7)</sup> しかし亜硝酸が硝酸塩に代つて還元され得る事は認められていない。即ち肝臓の酵素標品はアルデヒド酸化酵素方も示し基質の添加によつて硝酸還元も行うが亜硝酸の減少が起らない事は屢々述べた通りであるが更

に FAD を加えての亜硝酸減少もアルデヒドによつては促進されなかつた。しかし Westfeld 氏等<sup>11)</sup> は牛乳及び雞肝臓のキサンチン酸化酵素はグルタチオンの存在する場合にのみ亜硝酸を還元してヒドロキシルアミンを生ずる事を報告し、又我々も最近牛の肝臓酵素による亜硝酸の減少が硝酸還元と同様にアルデヒドの添加によつて促進される事を観察した。硝酸還元酵素と亜硝酸の還元に関するものが同一の酵素であるか否かは更に検討を要するが、少なくとも之等の反応に必須な成分は異なると思われる。アルデヒド或いはキサンチン酸化酵素も所謂メタロフラボプロテインの一種であつて、FAD が補酵素として重要な事は明らかにされている。しかし酵素蛋白との結合がかなり強い事は酵素標品の活性が FAD の添加を要しない事から推定される。之に対して亜硝酸の減少に関するものが非常に離れ易い事は本実験の結果からも明らかである。従つて酵素蛋白に補酵素等の因子を含めた意味に於ける硝酸還元酵素と亜硝酸還元酵素とは異なるものと思われる。又最近我々の研究室で DPN-FAD と共働し硝酸、亜硝酸、次亜硝酸及びヒドロキシルアミンを水素受容体とする酵素の存在が同じ雞肝臓について認められたが、<sup>12)</sup> 耐熱性、pH 依存性等の関係から全く異なつた酵素と推定される。

こうして肝臓組織中にも亜硝酸還元酵素が存在する事が推定され先に述べたようなオキシム代謝と硝酸還元酵素とを関連づける事が出来る。恐らく組織中には FAD 或いは酵素は局在して、局部的に十分作用し得る状態にあるものと思われる。しかし組織ホモネート或いは抽出液では之等の成分は均一化され FAD の濃度が低過ぎるために亜硝酸の減少は観察されなかつたもので、時々認められたのは特に FAD 含量の高い個体の場合と考えられる。

## 総 括

肝臓精製酵素に FAD を加えた場合亜硝酸の減少が起つた。この減少は酵素作用である事が確められ、特に FAD を加えなければ反応が起らない事、硝酸還元と同様に嫌氣的条件下のみ反応が進行する事及びその至適 pH 6.0、温度 50° も硝酸還元のものに類似している事等から亜硝酸還元酵素によると推定した。

## 文 献

- 1) Bernheim, F. and Dixon, M., 1928. *Biochem. J.*, 22: 125.
- 2) Dixon, M. and Thurlow, S., 1924. *Biochem. J.*, 18: 989.
- 3) Nason, A., 1956. *Inorganic Nitrogen Metabolism*, p. 109.
- 4) 大村浩久, 1954. *Enzymologia*, 17: 127.
- 5) 大村浩久, 1957. 九大農学芸誌, 16: 225.
- 6) 大村浩久, 1959. 九大農学芸誌, 17: 205.
- 7) 大村浩久, 1959. *Enzymologia*, 20: 271.
- 8) 大村浩久, 1959. 農化, 33: 1048.
- 9) Stumpf, P. K., 1952. *Phosphorous Metabolism*, II: p. 61.
- 10) 谷口茂彦・三井宏美・豊田淳三・山田敏郎・江上不二夫, 1953. *J. Biochem.*, 40: 175.

- 11) Westerfeld, W. W., Richert, D. A. and Higgins, E. S., 1956. *Inorganic Nitrogen Metabolism*, p. 429.
- 12) 山藤一雄・近藤 弘・大村浩久, 1950. *Enzymologia*, **14**: 153.
- 13) 山藤一雄・吉原典子・和田春子, 1950. *Enzymologia*, **14**: 170.
- 14) 山藤一雄, 1951. *Nature*, **167**: 770.
- 15) 山藤一雄・大村浩久, 1952. *Enzymologia*, **15**: 296.
- 16) 山藤一雄・大村浩久・三浦道雄, 1953. *Enzymologia*, **16**: 75.
- 17) 山藤一雄, 1955. *Rep. Agr. Biochem. Kyushu Univ.*, **15**: 13.
- 18) 山藤一雄・大村浩久, 1957. *Proc. Intern. Symp. Enzyme Chem.*, p. 173.
- 19) 山藤一雄・篠島豊・大村浩久・波多野昌二, 1959. *Enzymologia*, 投稿中.

### Summary

It is well known that nitrite is formed from nitrate by the catalytic action of the purified enzyme of liver with acetaldehyde, but not reduced further. However, less amounts of nitrite were accumulated in the reaction mixture when FAD had been supplemented.

At first, it was observed that the colorimetric estimation of nitrite was not so significantly inhibited by FAD and that nitrite could not be destroyed even if it had been boiled for 5 min. with FAD.

On adding FAD in the enzyme system, the decrease of nitrite was brought about but not stimulated by acetaldehyde or DPN, which are the effective hydrogen donor for the nitrate reduction by the same enzyme. The rate of decrease of nitrite was correlated with the amount of enzyme used and with the reaction time. Furthermore, the enzyme was most reactive at 50°C and at pH 6.0. These optimum points of temperature and pH coincide roughly with those of the nitrate reductase. Thus, it was suggested that the enzymatic diminution of nitrite might be attributed to the action of the nitrite reductase which was made reactive by addition of FAD.