

動物組織とくに胚と腹水腫瘍の Hydrogenase について

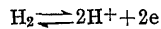
金沢大学大学院医学研究科第二病理学講座(主任 石川太刀雄教授)

金沢大学大学院医学研究科第一内科学講座(主任 武内重五郎教授)

田 中 康 夫

(昭和37年1月16日受付)

Hydrogenase (以下 H-ase と省略) は分子状水素の次式による可逆的酸化を触媒する。



この酵素は嫌気性従属栄養微生物に最も広く分布し、炭水化物などの嫌氣的分解、とくに解糖過程における3炭糖燐酸の脱水素反応の結果生ずる活性化水素の過剰部分を H_2 として放出することにより、解糖の調節機構としての役割を果し、しかもエネルギー効果を高めていると考えられる¹⁾²⁾。一方、自立栄養微生物にも H-ase の存在することが早くから知られており、水素菌などは分子状酸素による H_2 の酸化によって生長エネルギーを獲得し、 CO_2 を唯一の炭素源として利用できる³⁾。このことは H-ase の存在によつてはじめて可能なのである。ただし、これらの自立栄養微生物も、好氣的従属栄養微生物として継代培養すれば、H-ase は漸次失われてゆく⁴⁾。このことは H-ase の O_2 に対する著しい不安定性と関連がある。自立栄養微生物の中で、ある種の緑藻や光合成菌のような光合成微生物もまた、嫌氣的光還元過程において分子状水素を水素供与体として利用することができるが、そこにはやはり H-ase が存在している⁵⁾⁶⁾。また化学還元能力をもつ微生物では、Athiorhodaceae のようなものは H-ase によつて分子状水素を利用できるし、硫酸還元菌類は嫌気条件下で H-ase と硫酸還元酵素によつて硫酸塩を分子状水素で還元できる⁷⁾。

以上のように、H-ase をもつ生物の多くは嫌気性微生物であり、そうでないものでも比較的嫌気条件下の培養によつてはじめて H-ase をもちうるものが多いのであるが、正常代謝では H_2 の放出を行わない好氣的微生物でも H-ase をもたないわけではない。Azotobacter⁹⁾¹⁰⁾、Acetobacter¹¹⁾、Bacillus delbrückii¹²⁾、Streptococcus faecalis¹³⁾ などがそうである。とすれば、好氣的従属栄養微生物に属する高等動物の組織

ではどうであろうか。それらにはこれまで H-ase がみいだされたという報告はない。

著者は胚と腫瘍の細胞にこの酵素が存在する可能性を予想し、微弱ではあるがその活性をみいだしたので、その特異性を検討し、その出現の比較生化学的意義にふれたい。

実験材料と方法

1. 実験材料

1) 動物臓器: ハツカネズミ (以下ネズミと略) の新鮮臓器を生理的食塩水で洗つたのち、細切し、Streptolysin-S (金沢大学結核研究所 越村三郎教授の御好意により分与された最少溶血濃度 $=10^{-7}$ の標本) を 70mg% に加えた生理的食塩水中で、 37°C 10分間インキュベートして、含まれた赤血球を溶血させ、再び生理的食塩水で数回洗つてよく血球をのぞいてから、溜水を加えてワーリングブレンダーでホモジナイズする。ホモジネートを 3000rpm 10分間遠心し、上清をとる。

2) 血液: ヒト及びネズミの血液を等張食塩水で洗い、溜水で溶血させ、3000rpm 10分遠心して上清をもちいた。同一血液の血球と血清の分離には、ヘパリンナトリウム (10^3 ヘパリン単位/ml) 1滴を血液に加え、10分間遠心して行なつた。

3) 胚: モリアオガエル (*Rhacophorus schlegelii* var *arborea*) 及びガマ (*Bufo vulgaris formosus*) の卵を実験室内でなるべく自然に近い状態におき、必要な時期まで発生をすすませて使用した。なお、卵は70%アルコールに30~45秒ひたしたのち、滅菌水で洗つてから、溜水を加えてホモジネートとした。

4) 腹水腫瘍: 雑系または dd 系ネズミ移植後 8~11日目の Ehrlich 腹水癌 (3倍体) を使用した。血性の腹水はなるべく使用をさけ、採取した腹水は Strep-

On the Hydrogenase of the Animal Tissues, especially in Embryonic Development and Ascites Tumor Cells. Yasuo Tanaka, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa); Department of Internal Medicine (Director: Prof. J. Takeuchi), School of Medicine, University of Kanazawa.

tolysin S を 70mg% に加えた生理的食塩水中で十分まぜ、37°C 10分間インキュベートし、再び生理的食塩水でよく洗つて、完全に赤血球を除いてから、溜水を加えてワーリングブレンダーでホモジネートとし、3000rpm 10分遠心してその上清をもちいた。

2. 酵素液の処理

上記の操作でつくつたそれぞれの遠心上清について、リン酸カルシウム・ゲル（以下ゲルと略）による吸着・溶離操作を行なつた。ゲルはいつも 100ml の 0.44M リン酸 2 ナトリウムと 100ml の 0.66M 塩化カルシウムをまぜ、濃アンモニアで pH 8.4 とし、これを大量の水で洗つてつくり、数時間以内に全量使用した。動物臓器では 2~3g、血液では 2ml、卵では 100~200 個程度のホモジネート遠心上清を大量の溜水のなかで上記量のゲルに吸着させ、ゲルを遠心管にうつし、3000rpm 10分間遠心して上清はすてる。もう一回ゲルを溜水で洗つたのち、イオン強度 0.1 のリン酸緩衝液 (pH 6.8) 10ml を加えてよくまぜ、遠心して上清をとる。同じイオン強度の液でもう 1 回洗つてから、イオン強度 0.2 の液 10ml で同様に操作する。このようにしてイオン強度 0.1 から 1.0 までの透明な抽出液（各々ほぼ 11~12ml）を得る。イオン強度 0.3 以上の溶離液はリン酸緩衝液 (pH 6.8) に塩化ナトリウムを計算量加えてつくつた。また、一部の実験にはホモジネート上清について Osborne 法による硫安分画を行なつてから、ゲル吸着操作を行なつた。即ち、硫安一定飽和で得られた沈澱をイオン強度 0.2 のリン酸緩衝液 (pH 6.8) にとかし、その遠心上清を氷室内で大量の M/400 リン酸緩衝液 (pH 6.8) に対して 4 時間、真空デシケータを利用して嫌氣的に透析後、上述のようにゲル吸着操作を行なつた。硫安沈澱は低温で嫌氣的に一夜放置しても活性が保たれるが、ゲル操作を行なつたものは一夜で失活するから、この操作後は直ちに実験に供した。酵素液の蛋白量は Lowry 法¹⁴⁾で定量した。

3. 反応及び測定方法

H-ase 活性の定量法については議論が多い。メチレン青のような 2 電子色素の存在で H₂ の吸収を測定する方法、isotope 交換反応による方法、1 電子色素（メチルヴィオローゲン¹⁵⁾ またはベンジルヴィオローゲン）の還元型からの H₂ の発生量を測定する方法などがあり、それぞれの得失が論じられているが²⁰⁾、ヴィオローゲン色素による方法は信頼度の高い方法としてよく用いられている。著者は微弱な活性を測定するために、種々の方法を検討し、化学的に還元したメチルヴィオローゲンの褪色（酸化）を比色定量する田

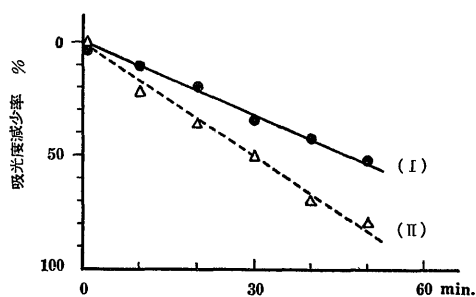
宮ら¹⁷⁾の方法がすぐれていることを確かめ、以後の実験に用いることにした。

ツンベルグ管の主室に酵素液・緩衝液・メチルヴィオローゲン (0.625mM) などの一定量を、側室にヒドロサルファイト 15mg を入れ、管内の空気をのぞき、燃焼管を通した N₂ をみだし、再び十分に排気する。排気・N₂ 充填を 3 回くりかえす。H-ase を比色定量する場合には O₂ をできるだけ厳重にのぞくことが必要である。37°C の湯浴につけ、10~15分おいて温度平衡に達してから内容を混和して反応を開始させる。以後は還元型メチルヴィオローゲン（青色）の褪色をツンベルグ管のまま Coleman 分光光度計で測定する。波長は 595m μ とする。ツンベルグ管は均質で無きずのものをもちい、湯浴の温度は 37 \pm 0.1°C 程度に保つ必要がある。反応は 60分以上行ない、10分ごとに手早く吸光値を測定する。なお、酵素のかわりに溜水を同量加えたものを対照として、毎回同時に測定した。酵素液は蛋白濃度がいつもほぼ同一 (25 μ g/ml またはそれ以下) になるようにうすめ、その 5ml を使用した。

5. 酵素活性のあらわし方

x 軸を時間 (分) とし、y 軸を吸光度 (E) の減少率 (%) として各測定値をプロットすると図 1 のよう

図 1 還元メチルヴィオローゲンの褪色酸化曲線



(I) 酵素液 0.5ml

(II) 酵素液 1.0ml

酵素材料は Ehrlich 腹水癌

な直線になる。この直線の勾配（吸光度減少率/時間 (分)）から対照のそれを引いた値は、稀薄な酵素液ではほぼ活性に比例する。そこで活性は上記の値を胚では胚 1 個あたりに、臓器・血液・腹水癌では蛋白量 (μ g) あたりに換算して示すことにした。

実験結果

I. 血液の H-ase 活性

ヒト及びネズミの血液を溶血・遠心後、その上清を

ゲルに吸着させ、段階的に各イオン強度の液で抽出液をつくり、その各々についてH-ase活性をはかつた。その結果、ヒトでもネズミでもH-ase活性はそれぞれイオン強度0.3、0.6及び0.8で溶離する分画にピークがある。イオン強度0.3溶離液の活性は他に比し非常に弱い。イオン強度0.6(a分画)、0.8(b分画)で遊離するものについて、(i) 酵素液のみ、(ii) 酵素液

を100°C 15分加熱、濾過したもの、(iii) 酵素液にFAD及びMn²⁺を加えたもの、それぞれの活性を測定してみると表1のような結果になつた。このことから血液中に不耐熱性のH-ase活性を呈する物質があり、FAD+Mn²⁺の添加は活性を低下させることがわかる。種々の酵素阻害剤の影響をみると、表2のようになるから、この酵素活性にはSH基と金属が関与し

表 1 ヒト及びネズミ血液 a・b 分画の H-ase 活性

	a 分 画		b 分 画	
	(ヒト) 活性 ×10 ⁻⁷	(ネズミ) 活性 ×10 ⁻⁷	(ヒト) 活性 ×10 ⁻⁷	(ネズミ) 活性 ×10 ⁻⁷
i) 酵 素 液	41.5	6.1	88.0	10.0
ii) 酵 素 液 + Mn ²⁺ + FAD	21.0	5.0	36.0	6.2
iii) 100°C 15分加熱後濾過酵素液 + Mn ²⁺ + FAD	0	0	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25m μmoles, MnSO₄ 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表 2 ヒト血球の H-ase 活性に対する各種阻害剤の影響

a 分 画					
阻 害 剤	モル濃度	% 阻害	阻 害 剤	モル濃度	% 阻害
NaN ₃	10 ⁻³	100	ク ツ ペ ロ ン	5×10 ⁻⁴	80
	5×10 ⁻⁴	100		2×10 ⁻⁵	30
	2×10 ⁻⁵	20		10 ⁻³	0
オ キ シ ン	10 ⁻³	100	P C M B	5×10 ⁻⁴	0
	5×10 ⁻⁴	0		10 ⁻³	100
ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ	10 ⁻³	0	モノヨード醋酸	5×10 ⁻⁴	0
	5×10 ⁻⁴	0		10 ⁻³	0
o-フェナンスロリン	10 ⁻³	0	o-ヨードソベンゾアート	5×10 ⁻⁴	0
	5×10 ⁻⁴	0		10 ⁻³	0
α, α'ジピリジル	10 ⁻³	100		5×10 ⁻⁴	0
b 分 画					
NaN ₃	10 ⁻³	100	ク ツ ペ ロ ン	2×10 ⁻⁵	0
	5×10 ⁻⁴	10		10 ⁻³	0
	2×10 ⁻⁵	0		5×10 ⁻⁴	0
オ キ シ ン	10 ⁻³	4	P C M B	10 ⁻³	100
	5×10 ⁻⁴	0		5×10 ⁻⁴	0
ジエチルジチオカルバミン酸ソーダ	10 ⁻³	100	モノヨード醋酸	10 ⁻³	45
	5×10 ⁻⁴	30		5×10 ⁻⁴	0
o-フェナンスロリン	2×10 ⁻⁵	0	o-ヨードソベンゾアート	10 ⁻³	0
	10 ⁻³	0		5×10 ⁻⁴	0
α, α'ジピリジル	5×10 ⁻⁴	0			
	10 ⁻³	100			
	5×10 ⁻⁴	30			

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

ていると考えられる。

ついで表3のように、硫酸処理を加えて、a・b分画の部分精製を行なつて、それぞれA・B分画をつくり、同様に活性を測定すると、FADとMn²⁺を加えた場合に著明な活性が見られるが、それらを添加しない酵素液にはほとんど活性がないことがわかつた(表4)。このことは細菌のH-aseの場合と同様に、硫酸処理が酵素の金属部分乃至フラビン部分を遊離させるものと考えれば説明がつく(18)(19)。

そこで、ヒト血液のA・B分画についてFADと種々の金属イオンを加えて活性を測定すると表5、6のようになった。Fe²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺がA・B分画に対しても有効であり、B分画に対してはCu²⁺も有効性を示したが、その他の金属イオンにはしらべた限りでは有効なものが見いだされなかつた。従つてA・B分画の差は、質的にはB分画におけるCu²⁺イオンの賦活にある。このことはa・b分画の活性に対するジェチルジチオカルバミン酸阻害の差とよく適合する。

なおヒトの血液の血球と血清を分離して、酵素活性の分布をしらべた結果、つねに血球に活性が存在し、血清には全くそれが認められなかつた(表7)。

II. 臓器のH-ase活性

ネズミの臓器のうち、脳・心・肺・肝・腎・骨格筋についてH-aseの有無を調べた。既述のように、血球中にH-ase活性があるので、測定にあつては

表3 [A],[B]分画抽出操作

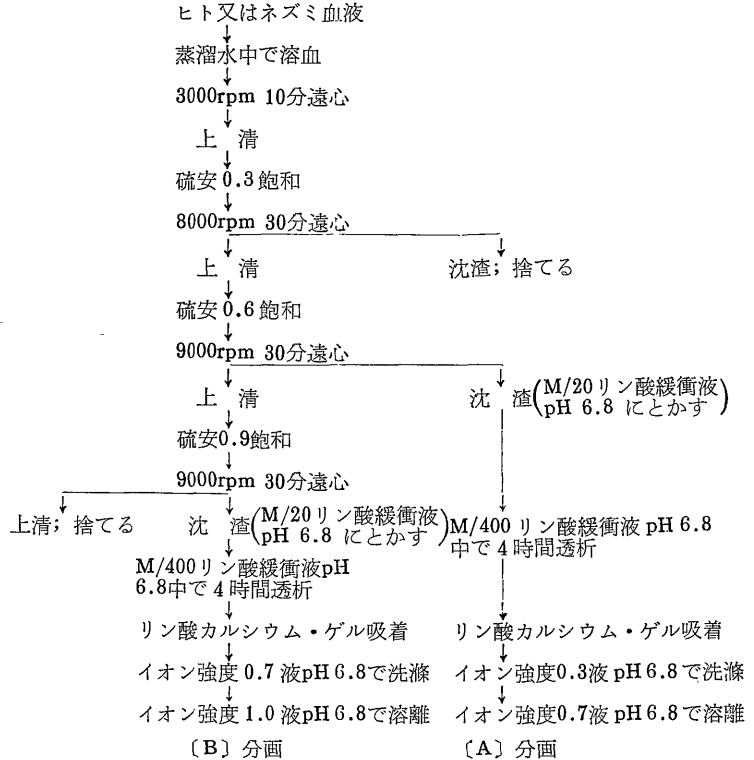


表5 ヒト血液A・B分画のH-ase活性に及ぼす各種金属の影響

動物		-	+ MgSO ₄	+ MnSO ₄	+ FeSO ₄
ヒト	A (×10 ⁻⁷)	7.6	12.0	6.0	17.5
	B (×10 ⁻⁷)	18.0	20.0	18.7	20.0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25m μmoles, 各種金属 0.125 μmoles, 最終液量 10 ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表4 ヒト及びネズミA・B分画のH-ase活性

	A 分 割		B 分 割	
	(ヒト) 活性 ×10 ⁻⁷	(ネズミ) 活性 ×10 ⁻⁷	(ヒト) 活性 ×10 ⁻⁷	(ネズミ) 活性 ×10 ⁻⁷
酵 素 液	79.3	1.0	12.0	5.0
酵 素 液 + Mn ²⁺ + FAD	238.0	27.0	85.0	25.0
100°C 15分加熱後濾過酵素液 + Mn ²⁺ + FAD	0	0	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25m μmoles, MnSO₄ 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表 6 ヒト及びネズミ血液 A・B 分割の H-ase 活性に及ぼす各種金属の影響

動物		-	+ MnSO ₄	+ MgSO ₄	+ FeSO ₄	+ Na ₂ MoO ₄	+ CuSO ₄	+ NiSO ₄	+ CoSO ₄	+ ZnSO ₄	+ AgNO ₃	+ Na ₂ WO ₄
ヒト	A (×10 ⁻⁷)	6.5	46.0	39.0	50.0	0	0	0	0	0	0	0
	B (×10 ⁻⁷)	17.0	50.0	45.5	60.0	0	45.5	0	0	0	0	0
ネズミ	A (×10 ⁻⁷)	1.9	15.0	12.5	17.0	0	0	0	0	0	0	0
	B (×10 ⁻⁷)	3.5	20.5	18.5	23.0	0	19.0	0	0	0	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25 μmoles, 各種金属 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表 7 ヒト血球・血清の H-ase 活性 (×10⁻⁷)

	a 分割			b 分割		
	1	2	3	1	2	3
血 球	18	20	20	24.0	23.5	24.0
血 清	0	0	1.0	0	0	5

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表 8 動物臓器の H-ase 活性 (×10⁻⁷)

	心	肝	脳	肺	腎	骨格筋
1	3.3	2.4	1.3	0	0	0
2	3.3	1.8	0.7	0	0	0
3	3.0	0.7	0	0	0	0

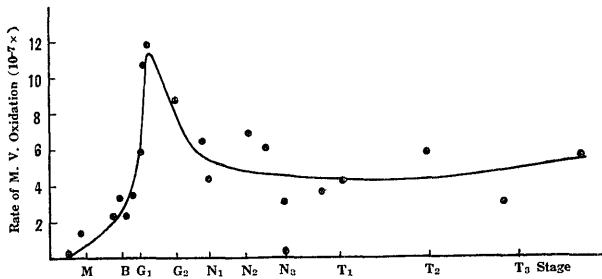
反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

Streptolysin-S 処理によつて臓器から血球をできるだけ除いた。動物各臓器についての H-ase 活性は表 8 のようで、心・肝・脳に多少の活性が認められ、肺・腎・骨格筋には全く活性が見られなかつた。活性の見られる臓器は血球の残存が考えられるので、その臓器に含まれているヘモグロビン量に等しいヘモグロビン量の血球の活性と比較してみると、臓器の活性はいずれもその臓器に含まれる血球の活性をこえなかつた。従つて、調べた限りでは成熟ネズミ臓器に H-ase 活性は全く存在しないことになる。

Ⅲ. 胚の H-ase 活性

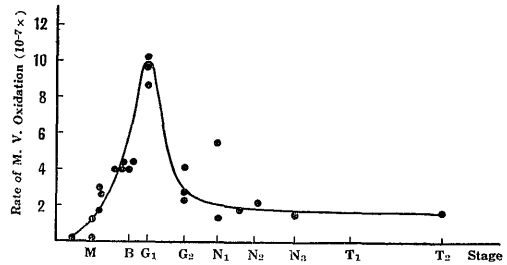
各発生段階のモリアオガエル卵の表面を滅菌後、溜

図 2 モリアオガエル卵発生に伴う H-ase 活性の消長



反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C
M=Morula, B=Blastula, G=Gastrula, N=Neurula, T=Tail bud

図 3 ガマ卵発生に伴う H-ase 活性の消長



反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C M=Morula, B=Blastula, G=Gastrula, N=Neurula, T=Tail bud

水を加え、1ml に15個の卵を含むホモジネートをつくり、3000rpm 15分 4°C 以下で遠心した上清をゲルに吸着させ、イオン強度 0.8 ~1.0の間で溶離させたものを酵素液とした。胚発生に伴う H-ase 活性の消長は図 2 のようになり、原腸胚初期にピークが示された。ガマ胚については全く同様に測定した結果は図 3 のようで、活性の消長はモリアオガエルの場合によく似ている。ただこの場合、ピークは多少胞胚期へずれているが、原腸胚の極初期ではやはり活性が高い。

つぎに、活性の高い原腸胚を多数集めてホモジネートをつくり、ゲルに吸着させ、各イ

表 9 モリアオガエル卵 H-ase 活性に及ぼす各種添加物の影響

添加物	-	+FAD	+MnSO ₄	+FAD +MnSO ₄	+FAD +FeSO ₄	+FAD +Na ₂ MoO ₄	+FAD +CuSO ₄
活性 ×10 ⁻⁷	17.0	2.0	4.0	28.0	28.5	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25 mμmoles, 各種金属 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C, 原腸胚中期卵にて測定

表 10 モリアオガエル卵硫酸分画操作後の H-ase 活性に及ぼす各種添加物の影響

添加物	-	+FeSO ₄	+MnSO ₄	+MgSO ₄	+Na ₂ MoO ₄	+CuSO ₄
活性 ×10 ⁻⁷	3.0	16.0	14.0	14.0	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25 mμmoles, 各種金属 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C, 原腸胚初期卵にて測定

オン強度の液で溶離液をつくと、蛋白量あたりの活性がモリアオガエル胚ではイオン強度0.6に、ガマ胚では0.8に一つのピークを示した。ゲル吸着を行ない、イオン強度0.3~1.0で溶離した酵素液では、表9のように、FADの添加はある場合は活性を低下させ、更にFe⁺²またはMn⁺²を加えると活性の回復または促進が起つた。硫酸0.3~0.9飽和でおとした蛋白を透析後、ゲル処理を行なつた酵素液では、表10のように、Fe⁺²・Mg⁺²・Mn⁺²が活性を促進したが、Mo⁺⁶はいつも全く活性促進を示さなかつた。FADの添加は、上記のイオンと共に加える場合以外は多くは活性を抑制した。CN阻害は10⁻³Mでは全く認められない。

なお活性が、丁度硫酸還元菌²⁰⁾における如く、硫酸還元酵素と共転しているかどうかを調べてみた。ハイドロサルファイトで化学的に還元したメチルヴィオローゲンの褪色を、硫酸ソーダ・チオ硫酸ソーダ・亜硫酸ソーダのそれぞれの10μmolesの存在で調べた結果、それらの基質を加えなかつた場合に比して活性はむしろ低下した。即ち、これらの酵素系は蛙胚の場合には存在していると思われない。

IV. 腫瘍の H-ase 活性

Ehrlich 癌腹水にまじっている赤血球を溶血させて完全に除いたものを材料とし、ゲル操作によつて各イオン強度における抽出液をつくり、そのH-ase活性を見ると、赤血球の場合にやや類似してイオン強度0.5(a分画)と0.9(b分画)の2つの活性のピークが見られる。そこで赤血球の場合と全く同一の操作で〔A〕分画及び〔B〕分画をつくり、その各々について検討を加えた。

a・b分画はそのままかなりの活性をもち、100°C 15分の加熱でその活性は失われ(表11)、各種阻害

表11 Ehrlich 腹水癌 a・b分画の H-ase 活性

	a分画	b分画
	活性 ×10 ⁻⁷	活性 ×10 ⁻⁷
酵 素 液	43.0	68.4
酵 素 液 +Mn ⁺² +FAD	24.4	35.0
100°C 15分加熱後濾過酵 素液+Mn ⁺² +FAD	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25 mμmoles, MnSO₄ 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

剤の影響を調べると、表12のようになる。即ち、両分画ともにPCMBとNaN₃による阻害があり、α, α'ジピリジルもかなりの阻害を示し、オキシソリン等はA分画を阻害する。このことから酵素は金属・SH酵素であることが予想されるが、両分画における阻害の決定的な差異は認められなかつた。

a・b分画にはFADやMn⁺²を添加すると、活性の抑制が起るが、硫酸処理を行なつて得たA・B分画ではFADまたはFMNさらにそれにMn⁺²を加えることは一層の活性の上昇を起した。この場合Mn⁺²だけの添加では活性上昇は乏しいが、フラビン体を共存させるとその活性促進がはつきり現われる(表13)。

つぎに、A・B分画につきFADとともに各種金属イオンを添加してみると、Fe⁺²・Mn⁺²・Mg⁺²がこの順に有効である(表14)。なおCo⁺²に多少の効果があり、B分画に対してはZn⁺²・Cu⁺²が多少の効果を示した。Mo⁺⁶・W・Ag等はどちらの分画についても活

表 12 Ehrlich 腹水癌の H-ase 活性に対する各種阻害物質の影響

a 分 割					
阻 害 度	モル濃度	% 阻害	阻 害 度	モル濃度	% 阻害
NaN ₃	10 ⁻³	100	ク ツ ペ ロ ン	5×10 ⁻⁴	15
	5×10 ⁻⁴	60		10 ⁻⁴	0
	10 ⁻⁴	10		10 ⁻³	0
オ キ シ ン	2×10 ⁻³	50	P C M B	5×10 ⁻⁴	0
	10 ⁻³	0		10 ⁻³	70
ジエチルジチオカル パミン酸ソーダ	2×10 ⁻³	0	モ ノ ヨ ー ド 醋 酸	5×10 ⁻⁴	60
	10 ⁻³	0		10 ⁻³	0
	5×10 ⁻⁴	0		5×10 ⁻⁴	0
o-フェナンスロリン	2×10 ⁻³	65	o-ヨ ー ド ソ ベ ン ズ ア ー ト	10 ⁻³	0
	10 ⁻³	0		5×10 ⁻⁴	0
α, α' ジピリジル	5×10 ⁻⁴	0			
	10 ⁻³	25			
b 分 割					
NaN ₃	10 ⁻³	50	α, α' ジピリジル	10 ⁻³	70
	5×10 ⁻⁴	40		5×10 ⁻⁴	40
オ キ シ ン	2×10 ⁻³	0	ク ツ ペ ロ ン	10 ⁻³	0
	10 ⁻³	0		5×10 ⁻⁴	0
ジエチルジチオカル パミン酸ソーダ	5×10 ⁻⁴	0	P C M B	10 ⁻³	90
	2×10 ⁻³	0		5×10 ⁻⁴	70
	10 ⁻³	0		10 ⁻³	55
o-フェナンスロリン	5×10 ⁻⁴	0	モ ノ ヨ ー ド 醋 酸	5×10 ⁻⁴	0
	2×10 ⁻³	0		10 ⁻³	5
	10 ⁻³	0		5×10 ⁻⁴	0
	5×10 ⁻⁴	0		10 ⁻³	5

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表 13 Ehrlich 腹水癌細胞 A・B 分割の H-ase 活性に及ぼす各種添加物の影響

添 加 物	-	+FMN	+FAD	+MnSO ₄	+FMN +MnSO ₄	+FAD +MnSO ₄
A ×10 ⁻⁷	3.0	12.0	27.6	3.6	33.0	36.8
B ×10 ⁻⁷	12.0	23.5	30.5	15.0	47.0	48.5

反応組成: 抽出液 5ml, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, FAD 1.25 μmoles, FMN 1.25 μmoles, MnSO₄ 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

表 14 Ehrlich 腹水癌細胞 A・B 分割の H-ase 活性に及ぼす各種金属イオンの影響

添加物質	-	+ MnSO ₄	+ MgSO ₄	+ FeSO ₄	+ Na ₂ MoO ₄	+ CuSO ₄	+ NiSO ₄	+ CoSO ₄	+ ZnSO ₄	+ AgNO ₃	+ Na ₂ WO ₄
活性 (×10 ⁻⁷)											
A	12.2	62.0	54.0	70.0	0	0	12.5	16.0	0	0	0
B	15.8	59.0	47.0	66.8	0	25.4	0	18.7	15.0	0	0

反応組成: 抽出液 5ml, FAD 1.25 μmoles, メチルヴィオローゲン 1.1125 μmoles, 各種金属 0.125 μmoles, 最終液量 10ml, 気相 N₂, 温度 37.0°C

性促進は全くない。

なお、酵素液に DPN 0.5 μ moles または 10.0 μ moles, 焦性ブドウ酸 2 μ moles + コカルボキシラーゼ 3 μ moles, 酵素煮沸抽出液 1ml などを加えてみても活性の促進は全く認められなかつた。

考 察

筆者らが得た結果では、蛙胚・Ehrlich 癌細胞・成熟個体の赤血球 (ネズミ・ヒト) に H-ase 活性があるけれども、ネズミ諸臓器には活性はほとんど見いだされない。臓器に示された多少の活性も臓器に含まれる赤血球に由来するものである。Ehrlich 癌と赤血球には、ゲルに対する吸着操作上 2 つまたはそれ以上にわかれる活性分画がある。即ち、前者ではイオン強度 0.5 と 0.9 の分画、後者では 0.6 と 0.8 の分画である。一方蛙肺にはイオン強度 0.6 または 0.8 の分画一つが得られる。これらの分画に対する各種阻害剤の効果をみると、 NaN_3 ・ α, α' ジピリジル・オキシシンが阻害することから、酵素が金属酵素である可能性が高い。これらの分画に硫安処理・透析操作を加えると、活性が殆んど失われるのに、フラビンと特定金属イオンを添加すると活性が強く回復することも、この酵素が金属フラビン酵素であることを示すように思われる。

Shug et al¹⁸⁾ は *Clostridium pasteurianum* の H-ase が同様に硫安処理で活性を失い、FAD と Mo の添加で活性の回復することを見ている。Gest²⁾ は生理的に H_2 を産生できる 偏性及び通性の嫌気性菌 (*Clostridium*, *Desulfovibrio*, *anaerobic micrococci*, *Coli-aerogenes* 等) は、その H-ase が 2 種の金属 (第 1 金属は恐らく Fe^{+2}) をもつフラビン酵素 (Type I H-ase) であり、分画操作により一方の金属を失った Type II の H-ase になり得るが、生理的には H_2 を産生しない好気性菌 (*Azotobacter*, *Acetobacter*, *Hydrogenomonas* 等) には Type II の H-ase だけ、光合成的微生物 (例えば *Rhodospirillum rubrum*) には両型の中間型でもいうべきものがあると主張している²¹⁾¹⁹⁾。メチルヴィオローゲンのような一電子受容体への電子伝達は第 2 の金属の存在によると考えられるから、Type II の H-ase は同色素を電子受容体になし得ない。第 2 金属については、Gest²⁾ はおそらく Mo であろうと考えている。Whiteley & Ordal²²⁾ は *Micrococcus lactilyticus* の H-ase が FAD・Mo・Fe を持つと考え、Peck & Gest²³⁾ も同菌及び *Clostridium butylicum* の H-ase で Mo・Fe の存在を主張している。ところが Racker & Vishniae²⁴⁾ は *Hydrogenomonas rublandii* の H-ase が Mn・FAD 酵素

であることをみだしている。一般には H-ase の活性基として Fe の存在を支持するものが多いが²⁵⁾²⁶⁾、Mahler²⁷⁾ は H-ase の第 1 金属が Fe^{+2} または Mn^{+2} 、第 2 金属は Mo または Mn であろうと考えている。しかし一方 Winfield²⁸⁾ のように H-ase の Fe 要求または Fe による活性化は Fe が H-ase の組成となつていとは限らず、H-ase と他の acceptor の電子伝達を助けるにすぎないと考える者もある。このような仮説は H-ase の金属が研究者により、また H-ase の起源により異なることを説明するのに便利である。

著者等のデータでも阻害実験及び金属添加実験によれば、赤血球の H-ase の金属は Fe^{+2} ・ Mn^{+2} である可能性が高く、B 分画では Cu^{+2} も関与するように見えるし、胚では Fe^{+2} ・ Mn^{+2} 、Ehrlich 癌では Fe^{+2} ・ Mn^{+2} のほかに、A 分画では Ni・Co, B 分画では Cu・Co・Zn も活性の促進を起した。また、 Mg^{+2} がいずれの分画の活性も促進したが、 Mg^{+2} や Zn^{+2} などは電子伝達に関与しないから、これらの促進効果は別の機序によるものであろう。共通して Fe^{+2} と Mn^{+2} に効果が見られたのであるが、といつても、それらの H-ase を $\text{Fe}\cdot\text{Mn}\cdot\text{SH}$ ・フラビン蛋白であるとする決定的な根拠は現在までつかまえていない。

Rittenberg²⁹⁾ は、H-ase という酵素は原始地球の大気が酸素を欠き、水素に富んでいた時代 (カンブリア前期) に生じた原始的な型の酵素であるとしている。しかし地球創生期に豊富にあつたと考えられる水素³⁰⁾は絶えず宇宙へと拡散したはずだから、原始生物が発生を開始した時代の地球上の大気が H_2 に富んでいたとは考えにくい。

原始生物が営んだエネルギー獲得手段はおそらく現在の無酸素解糖様式に等しいか、あるいはそれに近いものであつたと考えられるが、H-ase は多分その解糖に共働して過剰の電子の処理に役立ち、それによつてエネルギーレベルを一段高めるものとしてこの時代に登場したものと考えられる¹⁾²⁾。この点では H-ase は好氣的生物における呼吸系、ことにチトクロームチトクロームオキシダーゼ系に代る役割を果していたものとみなすことができる。これによつて、地上の大気には漸次分子状水素の蓄積が起つたであろう³¹⁾。そこで、つぎには H-ase をもつ生物が適応的に多数生れてこの分子状水素を電子供与体として利用するようになったと思われる。やがては光合成生物の登場が起り、大気の中に O_2 が生ずるとともに、生物にはヘム蛋白系による O_2 呼吸様式が発達し、それらヘム蛋白の前駆体ともいうべき H-ase は、遂に発展的な解消をとげたものと考えられるが、しかし現在なお偏性好

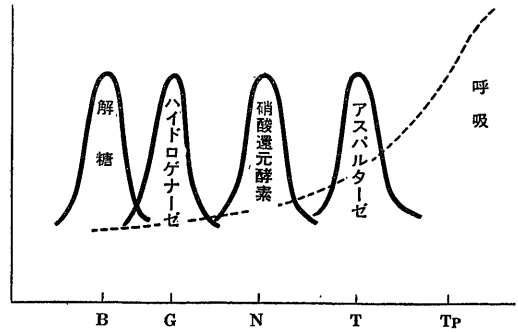
気性微生物や光合成生物のある種のものには H-ase がもち続けられている。これらは Gest²⁾ のいうように系統発生的な進化の遺跡と考えてよいであろう。だから高等動物組織中にも H-ase が見出されるとしても、それは当然同じ意味のものと考えられる。

なお既述のように、Gest²⁾ によれば *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Acetobacter* などの好気性菌の H-ase は一電子色素との電子転移は行ないえない型であるが、高等動物組織に現在見出される二三の遺跡は、むしろ嫌気性微生物または光合成菌の H-ase に性質が近く、一電子色素との電子転移が可能である。このことは現在の高等生物は、生物進化の系統樹において光合成生物に近く、現存する好気性微生物とはむしろ遠い位置にあることを意味するのかも知れない。

H-ase には以上のような系統発生的な意味を考えることができるのであるが、これが胚の初期発生の一時期に出現することの意味は何であろう。ここに J. Needham³²⁾ の「化学的にも個体発生は系統発生を繰返す」という化学的の反覆説をあげなければならない。ただしこの説をうらづける例はこれまであまり十分であつたとはいえない。この説の根拠の一つはニワトリ胚における N 排泄様式の変遷であるが、尿素排泄期においても尿毒サイクルは完成されておらず、アルギナーゼによつて卵黄顆粒のアルギニンから尿素が生ずるにすぎない³³⁾³⁴⁾。より適切な例は、Ohara, Suyama³⁵⁾、倉田³⁶⁾、山本³⁷⁾らにより見出された胚における硝酸還元酵素の出現であろう。系統発生において、O₂ 呼吸以前に出現したと考えられる硝酸呼吸(硝酸還元酵素)が個体発生においても胚の神経胚期に出現するが、成熟個体では消失している。また最近、倉田³⁸⁾はアスパルターゼが胚の尾蕾期初期に出現することを見出しているが、この酵素も系統発生的には出現時期が早い。Braunshstein³⁹⁾によるとこの酵素は、従属栄養生物による地上のアミノ酸の消費が進み、アミノ酸が不足してくるにつれて、生物が脂肪酸による NH₃ 固定によつてアスパラギン酸及びグルタミン酸を合成し、これからアミノ基転移によつて各種アミノ酸を合成する能力を持たざるを得なくなった時期に出現した酵素と考えられ、しかもアスパルターゼの方がグルタミン酸脱水素酵素よりもより始原的なものと考えられる。

系統発生的に意味の深い諸酵素の個体発生における出現の状態は図 4 のような模型図で示される(この図はあくまで模式図であり、各曲線のスケールは勿論異なっている)。この図に見る各酵素の出現順序は、系統発生において考えられているそれらの出現順序に驚くほどよく一致しているのである。これらの酵素の

図 4 蛙肺初期発生における諸酵素の出現順序(模型図)



B=胞胚期, G=原腸胚期, N=神経胚期,
T=尾蕾期, Tp=オタマジャクシ

うち、解糖というような重要なエネルギー過程は始原生物から現代の生物まで退化することなくうけつがれ、個体発生においても胞胚期でピークを作つた各解糖酵素は一旦活性低下後、それぞれがいろいろの発生時期で小さなピークをつくりながら、結局成熟個体までうけつがれてゆく³⁰⁾。それに比してハイドロゲナーゼ・硝酸還元酵素・アスパルターゼのような生物進化過程のうちに存在の意義を失つて退化したと考えられるものは、個体発生においても、個体の成熟につれて消失してしまうのである。ただ成熟個体の組織でも、最も未分化な組織、即ち腫瘍のような祖先帰りを示す組織には再び硝酸還元酵素・ハイドロゲナーゼが微弱ながら出現することが期待されてくる。実際、悪性腫瘍における硝酸還元酵素の出現が確かめられている³⁷⁾、著者は Ehrlich 癌における H-ase 活性の出現を確かめたのである。ただ、H-ase 活性が成熟個体において特に酸素分圧の高い場所に存在する赤血球にだけ何故残っているのかという疑問については現在答える何の根拠もない。あるいは血球が早期に核を失う細胞であることに、H-ase を完全に退化させ得ない理由を求めることができるのかも知れない。

結 論

ネズミ及びヒトの赤血球、蛙胚及び Ehrlich 腹水癌細胞に、化学的に還元したメチルグイオローゲンの酸化を比色定量する方法により H-ase 活性を認めた。

1) ヒト及びネズミの赤血球の活性分画はゲル吸着後、イオン強度 0.6 及び 0.8 で遊離し、NaN₃・α, α' ジピリジル・PCMB・モノヨード酢酸などで活性阻害をうけ、0.8 遊離液はジエチルジチオカルバミン酸の阻害をうける。硫酸処理を行なつた分画はいずれも FAD 及び Fe・Mn・Mg のいずれかの添加で活性が増加し、

0.8分画にはCuの添加もまた活性の増加を示した。

2) ネズミ臓器中、脳・心・肺・肝・腎・骨格筋にはいずれもH-ase活性は見られなかった。

3) カエル胚では原腸胚初期にH-ase活性のピークがある。活性分画はゲル吸着後イオン強度0.6(モリアオガエル)及び0.8(カマ)で遊離し、硫酸処理後の遊離液ではFADとFe・Mn・Mgのいずれかの添加は活性を増加した。

4) Ehrlich腹水癌ではゲル吸着後イオン強度0.5及び0.9で遊離するH-ase活性分画がある。活性は $\text{NaN}_3 \cdot \alpha, \alpha'$ ジピリジル・PCMBなどの阻害をうけ、硫酸処理を行なうとFADまたはFMNとFe・Mn・Mgのいずれかの添加は活性を増進し、Ni・Co・Cu・Znでも活性促進作用がみられた。

5) これらの動物組織におけるH-ase出現の比較生化学的意義を論じた。

終りに御指導・御校閲を得た第二病理学教室石川教授、第一内科学教室谷野名誉教授、武内教授に深く感謝します。また絶えず御教示と御援助を頂いた協同研究者倉田助教授ならびに御協力を戴いた餅谷良平君その他の第二病理学教室及び第一内科学教室各位に厚く感謝します。

文 献

- 1) 尾田義治 : 科学, 25, 455 (1955).
- 2) Gest, H. : Proc. Internatl. Symp. Enz. Chem. Tokyo-Kyoto, 1957, I.U.B. Symp. Ser. p. 250. Maruzen, Tokyo, 1957.
- 3) Kaserer, H. : Z. Landwirtschaft. Versuchsw. Deut. Oesterr. 8, 789 (1905); Zent. Bakteriolog. Parasitenk. Abt. II, 16, 681 (1906).
- 4) Kluyver, A. J. & Manten, A. : Antonie van Leenwenhoeck J., 8, 71 (1948).
- 5) Gaffron, H. : Am. J. Botan., 27, 273 (1940).
- 6) Gest, H. : J. Bacteriol., 63, 111 (1952).
- 7) Stephenson, N. & Stickland, L. H. : Biochem. J., 25, 215 (1931).
- 8) Gest, H. & Kamen, M. D. : Science, 109, 558 (1949).
- 9) Lee, S. B. & Wilson, P. W. : J. Biol. Chem., 151, 377 (1943).
- 10) Green, M. & Wilson, P. W. : J. Bacteriol., 65, 511 (1953).
- 11) Wieland, H. & Pistor, H. J. : Ann., 522, 116 (1936).
- 12) Yamagata, S., & Nakamura, H. : Acta Phytochim. (Japan), 10, 297 (1938).
- 13) Smith, G. N. & Marshall, R. O. : Arch. Biochem. Biophys., 39, 395 (1952).
- 14) Lawry, O. H., Rosebrough, N. J., Farry, A. L. & Randall, R. J. : J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).
- 15) Smith, C. R. : J. Am. Chem. Soc., 46, 414 (1924).
- 16) 赤堀 編 : 酸素研究法, II, 508頁, 朝倉書店, 東京, 1956.
- 17) Tamiya, N., Kameyama, T., Kondo, Y. & Akabori, S. : J. Biochem. (Japan), 42, 613 (1955).
- 18) Shug, A. L., Wilson, P. W., Green, D. E. & Mahler, H. R. : J. Am. Chem. Soc., 76, 3355 (1954).
- 19) Peck, H. D. Jr. & Gest, H. : J. Bact. 71, 70 (1956).
- 20) Ishimoto, M., Kondo, Y., Kameyama, T., Yagi, T. & Shiraki, M. : Proc. Internatl. Symp. Enz. Chem., Tokyo-Kyoto, 1957, I.U.B. Symp. Ser., 2. p. 229, Maruzen, Tokyo, 1957.
- 21) Gest, H., Judis, J. & Peck, H. D. Jr. : in "Inorganic Nitrogen Metabolism" (W. D. McElroy and B. Glass, eds.) p. 298. Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956.
- 22) Whiteley, H. R. & Ordal, E. J. : in "Inorganic Nitrogen Metabolism" (W. D. McElroy and B. Glass, eds) p. 521. Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956.
- 23) Peck, H. D. Jr. & Gest, H. : J. Bact., 73, 569 (1957).
- 24) Packer, L. & Vishniac, W. : Biochim. et Biophys. Acta, 17, 153 (1955).
- 25) Hoberman, H. D. & Rittenberg, D. : J. Biol. Chem., 147, 211 (1943).
- 26) Waring, W. S. Berkman, C. H. : Arch. Biochem., 4, 75 (1944).
- 27) Mahler, H. R. : Advances in Enz., 17, 247 (1956).
- 28) Winfield, M. E. : Revs. Pure and Appl. Chem., (Australia) 5, 217 (1955).
- 29) Rittenberg, D. : Proc. Internatl. Symp. Enz. Chem. Tokyo-Kyoto, 1957, I. U. B. Symp. Ser. 2. p. 256. Maruzen, Tokyo, 1957.
- 30) Sokolov, V. A. : The Origin of Life on the Earth, I.U.B. Sympos. Ser. vol. 1. p. 54, Pergamon Press, New York etc. 1959.
- 31) Sapozhnikov : 大滝哲也訳, 生物科学 (岩波), 5, 87 (1953).
- 32) Needham, J. : Chemical embryology, 2, 1132, Univ. Press Cambridge (1931).
- 33) Needham, J., Brachet, J. & Brown, R. K. : J. Exptl. Biol., 12, 321-336 (1935).
- 34) Eakin, R. E. & Fisher, J. R. : in "A Symposium on the Chemical Basis of Development," (W. D. McElroy and B. Glass), pp. 514-522. Johns Hopkins Press, Balti-

- more, 1958. 35) Ohara, M. & Suyama, T. : Nature, 169, 285 (1952). 36) 倉田自章 : 蛋白質・核酸・酵素, 1, 32 (1956). 37) 山本彰芳 : 十全医会誌, 62, 144 (1959). 38) 倉田自章 : 未発表. 39) Braunshtein, A. E. : The Origin of Life on the Earth, I.U.B. Sympos. Ser. Vol. 1. p. 527, Pergamon Press, New York, 1959.

Abstract

A hydrogenase activity was observed by measuring colorimetrically the rate of methylviologen decolorization in the red blood cells of adult animals (mouse and human), embryo of the frog and Ehrlich ascites tumor cells. The sensitivity to inhibitors, such as azide, α,α' -dipyridyl, PCMB etc. suggested that the enzyme is a metal sulfhydryl protein. The activity of this enzyme fractionated with ammonium sulfate and then treated with calcium phosphate gel was generally activated by addition of FAD and metal such as Fe^{++} , Mn^{++} , Mg^{++} etc.

From the point of view of comparative biochemistry, the significance of the appearance of this enzyme in the animal tissues was discussed.