

動物組織ことに胚と腫瘍の硝酸還元酵素について

〔金沢大学審査学位論文〕

金沢大学医学部第2病理学教室(主任 石川太刀雄教授)

金沢大学大学院医学研究科病理系第2病理学専攻

山 本 彰 芳

(昭和34年3月26日受付)

緒 言

細菌や植物には硝酸還元酵素が早くから見いだされ、その生化学的機作や生物学的意義に関する見解も急速に進歩してきた¹⁻⁴⁾。しかし動物組織の硝酸還元能の詳細についてはまだ未解決の問題が多く残されている。

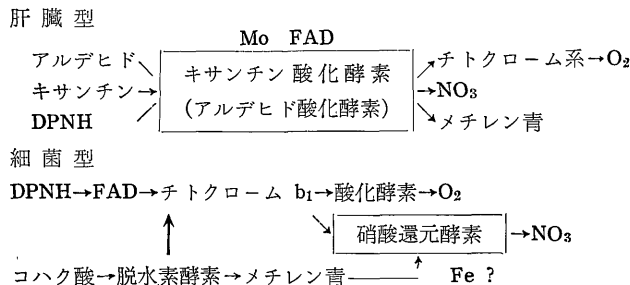
1902年 Stepanow⁵⁾ はウサギとイヌの臓器について調べた結果、臓器には亜硝酸塩を含むものと含まないものがあり、通常亜硝酸塩を含まない臓器は硝酸塩を還元する能力があることを示した。臓器の中では肝がもつとも多く研究の対象となり、その硝酸還元はキサンチン酸化酵素(またはアルデヒド酸化酵素)によつて行われていることがその後広く認められた⁶⁻¹¹⁾。Bernheimら⁹⁾によるとウシの肝での硝酸還元は2つの因子によつて行われる。その1つはおそらく牛乳のものと同じアルデヒド(キサンチン)酸化酵素であるが、他の1つは未知の酵素系でダイコクネズミやテンジクネズミの筋肉にも見いだされるとのべた。かれらはこれを **nitrate reducing system** とよんだが、この酵素系についての報告はそれ以後見られない。丹羽¹¹⁾ は硝酸還元酵素の比較的研究の中で、高等動物の肝での硝酸還元が主としてアルデヒド酸化酵素によつて行

われ、コハク酸はコハク酸脱水素酵素を介してこの酵素の電子供与体となり得るとした。いずれにせよ肝に見られる硝酸還元系は細菌のそれとは異なるものであるらしい。

ところが教室の大原、須山¹²⁾ はモリアオガエルの初期発生の途上一時的に細菌型に似た硝酸還元酵素が現われることを見だし、その後、武川¹³⁾ がそれを再確認した。動物組織のある特殊な状態のときにこのような異なつた型の硝酸還元酵素が存在することは、その生理的意義はまだ十分明らかではないにしても興味深いものがある。

なお肝臓型、細菌型とよばれる硝酸還元の電子伝達は、現在の段階では下の式に示したような経路によるものと理解されている^{14) 15)}。しかし細菌にも **molybdoflavoprotein** 型の硝酸還元酵素が見いだされているので、これらの名称は便宜上用いられているにすぎない。

われわれは動物組織の硝酸還元について研究を行つてきたが、さらに胚の発生に伴う硝酸還元二三の知見を加え、同時に細胞の異常増殖である悪性腫瘍と、正常増殖の過程に入る再生現象について研究を進めた結果、それらにいわゆる肝臓型硝酸還元酵素(アルデヒド酸化酵素)とは異なつた鉄型硝酸還元酵素を見い



On the Nitrate Reductase of the Animal Tissue, especially in Embryonic Development and Neogenesis. **Akiyoshi Yamamoto**, Department of Pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

だしたので、その性質を検討してここに報告する。

実験方法

1. 実験材料の前処置

動物臓器のうち、ウシのものは屠殺場より氷で冷しながら実験室に持ち帰り、他の動物のものは撲殺後ただちに切り出して使用する。ヒトの外科的に取り出した臓器も氷で冷しながらできるだけ早く実験室に運ぶ。つぎの操作までに時間を要するものは -18°C の氷室で凍結保存するが、2日以上経過したものは使用しなかつた。

モリアオガエルの卵は採集後実験室内で自然に近い状態におき、必要な時期まで発生を進ませ使用した。一連の測定には同腹の卵を用いるようにつとめた。

細菌による強い汚染が考えられる胚や臓器は70%アルコールに1分間浸して表面を滅菌したのち、滅菌水で十分洗ってから使用した。

2. 酵素液の処理

実験に用いる酵素液の処理についてはそれぞれの場合にふれることにするが、ここではつぎの2つの方法についてのべておく。

(1) 酵素液のシアン処理

酵素活性のシアンによる阻害が金属イオンの添加によつて回復するかどうかを調べるために、つぎのようにした。

酵素液を 10^{-3} Mシアン化カリウム (中和) 液のなかで6時間透析し、ついで流水で6時間透析してシアンを除く。シアンによる阻害率を見るときは酵素液の一部を蒸溜水と流水で同時間透析して対照とする。これらの操作は氷室 (6°C 以下) で行つた。

(2) リン酸カルシウムゲルによる段階的分散吸着法

リン酸カルシウムゲル (Ca-P ゲル) の作り方はいろいろあるが¹⁷⁻²⁰⁾、われわれはつぎの方法に統一した。

0.44 Mリン酸2ナトリウム 100ml と 0.66 M塩化カルシウム 100ml をはげしくふりながら急速に混和してただちに濃アンモニア水で pH 8.4 に調整し、これを蒸溜水でアンモニアが十分除かれるまで傾瀉して数回洗う。この全操作は氷室で行い、作つたゲルはただちに使用する。1実験材料に使用するゲルの量は上のようにして作つた全量の $\frac{1}{4}$ である。

定性的な実験には適量 (約 1~5g) の組織材料を同量の蒸溜水を加えてガラスホモジナイザーまたはワーリングブレンダーで十分つぶし、大量の蒸溜水のなかでゲルに吸着させる。上澄みに残つた未吸着の蛋白

は蒸溜水で洗つて除き、酵素を吸着したゲルは遠心管につめる。

再生肝の場合のように酵素活性の変動を日を追つて調べるときは、ゲルは特に嚴重に一定条件で作る必要があり、組織の使用量も未吸着蛋白が残らないように少量とした。またこの場合は酵素を吸着したゲルの水洗は行わず、ただちに遠心管につめた。

溶離に用いた液は第1表の線で囲まれた部分で、リン酸緩衝液と塩化ナトリウムの組み合わせで段階的なイオン強度の溶離液を得た。

ゲルに吸着させた酵素を溶離するには、遠心管内に10mlの溶離液を加えて十分にませたのち、600×g、5分間遠心し上澄みを試験管に取る。同じイオン強度の液でもう1回この操作をくり返し、これは捨てる。このようにしてイオン強度の低いものから高いものへ段階的に操作を進めて一連の溶離酵素液を得る。同じイオン強度の液で溶離を2回くり返すのは、はじめの操作でゲルに残つた酵素をできるだけ除き、つぎのイオン強度の溶離液にそれがまじるのをできるだけ少なくするためである。このようにして得た溶離酵素液は pH 7.4 に調整して反応に使用する。

3. 反応方法

反応はすべて Thunberg 管を用いて行い、嫌氣的に硝酸カリウムを還元させる。反応組成のなかで電子供与体とするものは側室に入れ、他のものは主室に入

表 1 イオン強度と溶離液との関係

イオン強度 (I/2)	リン酸緩衝液 (pH 6.8) の濃度 (M)	0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解する NaCl の濃度 (M)
0	0	
0.1	0.05	
0.2	0.1	0
0.3	0.15	0.1
0.4	0.2	0.2
0.5	0.25	0.3
0.6	0.3	0.4
0.7	0.35	0.5
0.8	0.4	0.6
0.9	0.45	0.7
1.0	0.5	0.8
∴		∴
1.5		1.3

れて真空ポンプで管内の空気を十分除き、反応開始とともに両者を混和する。

色素液を $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で還元するために、まず $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を除いたすべての反応成分をそれぞれの場所に入れ、さいごに $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を側室の色素液に加えたがちに脱気する。この操作はできるだけ手ばやく行わなければならない。反応液中に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ が大量に残るとそれだけで硝酸の還元が多少は起るので²³⁾ 色素液を還元するに必要なして十分な量を実験的に求めた。この量では亜硝酸の生成はまったく認められなかつた。

CO ガスによる活性の障害実験には還元型フェノサフラニンを電子供与体としたが、これには CO 発生装置²⁴⁾ より 3 方活栓を用いて、あらかじめ脱気操作まで行つた Thunberg 管に CO ガスを導き入れた。

なおすべての反応は pH 7.4, 37°C, 120 分間行い、また反応時間 0 分のもを同時に作り対照とした。

4. 試 薬

基質は 0.1 M 硝酸カリウムを、緩衝液は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を使用した。アルデヒドは 0.05 M とする。色素液はすべて 0.01% とし、色素液の還元は用時作成した 0.1% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で行う。他の試薬及びこれらの試薬の使用量についてはそれぞれの場所に示す。

5. 亜硝酸の定量

反応の終つた液は飽和酢酸ウラニル液 3.0ml を加えて除蛋白し、色素液を用いたものはその後約 50mg の亜硝酸を含まない活性炭を加えて脱色し、遠心上清から 4.0ml を取つてこれに 2.0ml の Griess-Ilosvay 試薬²⁵⁾ を加えて発色させ、10 分間放置したのちベックマン型分光光度計を用い 520m μ の吸光値を測定する。この測定値をあらかじめ亜硝酸ナトリウムを用いて作つた標準曲線と比較して、反応液中に生成した亜硝酸量を知る。

実 験 結 果

I. 成熟動物組織の硝酸還元

1. 酵素活性の臓器分布

動物組織の硝酸還元酵素について研究を進めて行くまえに、いろいろの種類動物や異なつた臓器にどの程度の硝酸還元能があるかを、まず粗標本で調べてみることにした。これまで動物組織ではおもに肝が研究の対象とされ、他の臓器についてはあまり調べられていないからでもある。

そこでまずウシ、イヌ、テンジクネズミ、ダイコクネズミ、ハツカネズミの 2, 3 の臓器について、その酵素活性を調べてみた。これらの臓器に 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてガラスホモジナイザーに 3 分間かけたものを酵素液とした (第 2 表)。

ウシ、ハツカネズミの心臓とイヌの血液ではまったく亜硝酸の生成は見られなかつたが、他の臓器では多少とも酵素活性が認められた。肝の酵素活性はもつとも大きい、肺にもなお相当の活性が見られる。このような硝酸還元が単一の酵素によるものかどうかは粗標本であるのでわからないが、少なくとも動物組織の硝酸還元能が肝以外の臓器にも広く存在することは、これらの結果から明らかである。

2. 電子供与体

動物肝の硝酸還元酵素は細菌に見られるものどちがつて、メチレン青 (Mb) を中間電子伝導体となしえず電子受容体となしうるが、コハク酸を電子供与体となしうるかどうかは意見の一致を見ない^{9) 11)}。そこでこの 2 つのもの作用を前の実験に用いた臓器について調べてみた (第 3 表)。

Mb はすべての臓器で反応開始後しばらくして脱色され、亜硝酸の生成量は減少した。酵素液には当然 Mb を還元する他の酵素系も同時に存在しているので、動物組織の硝酸塩を還元する酵素が Mb を中間電子伝導体とすることができるならば、亜硝酸の生成量は Mb の添加によつて増加してもよいはずである。それが減少したのは Mb がこの酵素に阻害的に働いたものか、或いは Mb もこの酵素によつて還元されるために丹羽¹¹⁾ のいうごとく硝酸と拮抗して阻害を起した

表 2 動物臓器の酵素活性

	肝	肺	脳	腎	心	血液
ウシ	0.307	0.143	0.014	0.079	0	—
イヌ	0.155	0.036	0.006	0.007	—	0
テンジクネズミ	0.297	0.136	0.010	0.050	—	—
ダイコクネズミ	0.252	0.199	0.014	0.034	—	—
ハツカネズミ	0.153	—	—	—	0	—

数値は酵素乾燥重量 1mg あたりの生成亜硝酸量 ($\mu\text{M/L}$)。

反応組成：蒸留水 2ml, 酵素液, 緩衝液, KNO_3 各 1ml, 計 5ml。

表 3 メチレン青、コハク酸の添加による亜硝酸生成の増減

	メチレン青				コハク酸			
	肝	肺	脳	腎	肝	肺	脳	腎
ウシ	-0.135	-0.143	-0.014	-0.079	-0.014	-0.014	-0.014	-0.025
イヌ	-0.079	-0.036	-0.003	-0.003	-0.050	+0.054	+0.039	0
テングネズミ	-0.249	-0.036	-0.006	-0.050	-0.018	+0.037	-0.010	+0.022
ダイコクネズミ	-0.177	-0.110	-0.007	-0.078	0	+0.029	-0.011	-0.007

数値は酵素乾燥重量 1mg あたりの生成亜硝酸増減量 ($\mu\text{M/L}$). 反応組成: 0.01% Mb (0.5M コハク酸または蒸留水), 酵素液, 緩衝液, KNO_3 , 蒸留水各 1ml, 計 5ml.

ものと考えられよう。

コハク酸の添加は臓器により、また個体によつてその作用が一定しなかつた。とくに肝の活性はどれもコハク酸で阻害された。これは肝の硝酸還元がコハク酸で促進されるという丹羽の模式¹¹⁾とは矛盾する。われわれの場合は Bernheim らのいういわゆる nitrate reducing system (NRS) が主動的に働いているために、陰性の結果が得られたのかもしれない。NRS はコハク酸で活性が促進されないとされているが、このことをさらに確かめるためにつぎの実験を行った。

ウシの肝を材料として、Bernheim らの方法⁹⁾に従つて酵素液を作つた。即ちこの酵素液は一時アルカリ性にするによつてアルデヒド酸化酵素は完全に破壊され、いわゆる NRS を含むものといわれている。

この酵素液にコハク酸を与えて硝酸還元を調べると、第 4 表のようにコハク酸の濃度が増加するに従つてますます亜硝酸の生成が阻害された。しかし酵素液を作るときコハク酸脱水素酵素がこわれる可能性もあるので、ウシの心臓から作つた Green-brei²⁰⁾を加えて反応を行つてみたが、第 5 表のようにやはりコハク酸の濃度の増加によつて阻害は強くなつた。

同様な結果はハツカネズミの肝を材料とした場合にも得られた (第 6 表)。なおコハク酸、Green-brei とともにメチレン青を加えると、コハク酸による酵素活性の阻害が見られなくなつている。

以上の結果から見ると、いわゆる NRS に関するかぎり、コハク酸-コハク酸脱水素酵素系が電子供与体となりえないことは確からしい。またアルカリ処理によつて酵素活性があまり低下しないのは、肝の硝酸還元活性の大部分がこの NRS によつて行われるためかもしれない。しかし、はたしてこのアルカリ処理がアルデヒド酸化酵素を完全に破壊するものであろうか。

そこでウシの肝を前と同様に処理してから、アルデヒドを加えて反応を行つてみると、アルデヒドの存在が強く亜硝酸の生成を促進した (第 7 表)。同様な結果はウシの肺、腎、脳、脾、脾、ダイコクネズミの

肝、肺、ハツカネズミの腎などから作つた酵素材料にも見られた。

これらから見ると、Bernheim らのいうごとくアルデヒド酸化酵素がアルカリ処理によつて完全に破壊するというは疑わしく、動物組織の硝酸還元の大部分は NRS によるのではなく、むしろアルデヒド酸化酵素によるらしいことになる。酵素液を pH 10 にしていろいろの時間放置したのち、中性にもどして実験してみても結果は同じであつた。

動物組織の硝酸還元を行う酵素がアルデヒ

表 4 コハク酸の酵素活性への影響 1 (ウシ肝)

	終濃度 (M)	生成亜硝酸量* ($\mu\text{M/L}$)
—		0.274
コハク酸	10^{-3}	0.256
〃	10^{-2}	0.248
〃	10^{-1}	0.110

* 酵素乾燥重量 1mg あたり。反応組成: コハク酸, 酵素液, 緩衝液, KNO_3 , 蒸留水各 1ml, 計 5ml.

表 5 コハク酸の酵素活性への影響 2 (ウシ肝)

	コハク酸終濃度 (M)	生成亜硝酸量* ($\mu\text{M/L}$)
—		0.193
Green-brei		0.193
{コハク酸 Green-brei	10^{-3}	0.171
{コハク酸 Green-brei	10^{-2}	0.199
{コハク酸 Green-brei	10^{-1}	0.075

* 酵素乾燥重量 1mg あたり。Green-brei 乾燥重量 5.5mg/ml. 反応組成: コハク酸, Green-brei, 酵素液, 緩衝液, KNO_3 各 1ml, 計 5ml.

表 6 コハク酸の酵素活性への影響 3 (ハツカネズミ肝)

	生成亜硝酸量* ($\mu\text{M/L}$)
—	0.157
コハク酸	0.063
{コハク酸 Green-brei	0.093
{コハク酸 Green-brei メチレン青	0.128

* 酵素乾燥重量 1mg あたり。Green-brei はハツカネズミ心臓より作成。反応組織：0.5M コハク酸，Green-brei，メチレン青，酵素液，緩衝液， KNO_3 各 1ml，計 6ml。

表 7 アルデヒドの酵素活性への影響 (ウシ肝)

	生成亜硝酸量* ($\mu\text{M/L}$)
—	0.123
ベンズアルデヒド	0.309
クロトンアルデヒド	0.334

* 酵素乾燥重量 1mg あたり。反応組成：アルデヒド，酵素液，緩衝液， KNO_3 蒸溜水各 1ml，計 5ml。

表 8 種々の還元型色素の酵素活性への影響 (ウシ肝)

	生成亜硝酸量* ($\mu\text{M/L}$)	促進率 (X)	
酸化還元色素 (還元型)	中 性 赤	0.897	4.7
	フェノサフラニン	0.795	4.1
	ニ ー ル 青	0.658	3.4
	F A D	0.456	2.4
	F M N	0.432	2.3
	メ チ レ ン 青	0.192	1.0
	ト ル イ ジ ン 青	0.192	1.0
チ オ ニ ン	0.156	0.9	
ベンズアルデヒド	0.390	2.0	
—	0.192	1.0	

* 酵素乾燥重量 1mg あたり。反応組成：色素液， $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ，酵素液，緩衝液， KNO_3 各 1ml，計 5ml。下段 2 者は色素液と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ の変りにベンズアルデヒドと蒸溜水各 1ml，または蒸溜水 2ml。

ドを電子供与体となしうることは明らかとなつたが、ついでいろいろの酸化還元色素の還元型について電子供与体となりうるかどうかを調べてみた。実験材料はウシの肝を用い、これに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH

表 9 PsH_2 とベンズアルデヒドによる亜硝酸生成量 (ウシ)

	肺	腎	脳	脾	脾
Ps-H_2	0.288	0.145	0.036	0.060	0.217
ベンズアルデヒド	0.182	0.084	0.018	0.032	0.117

数値は酵素乾燥重量 1mg あたりの生成亜硝酸量 ($\mu\text{M/L}$)。反応組成： PsH_2 2ml,* 酵素液，緩衝液， KNO_3 各 1ml，計 5ml。アルデヒドを用いるときは， PsH_2 の変りにベンズアルデヒド，蒸溜水各 1ml とする。*フェノサフラニ 1ml+ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 1ml (以下この略号を用いる)。

7.4) を加えてホモジナイズしたのち、フッ化ナトリウムを 2% の割合になるように加えて室温で 24 時間自家融解させ、この遠心上清を流水で 6 時間透析して酵素液とし、反応させた (第 8 表)。

表にはこれらの色素のうちメチレン青とほぼ同じ酸化還元電位をもつものは電子供与体となつておらず、かなり電位の低いものが有効であることが示されている。このことからこの酵素自身の酸化還元電位は相当低いことが推定されるし、フラビンが電子供与体となりうることは、それだけで確かなことはいえないけれども、この酵素の活性基に FAD (または FMN) が関与しうることを想像させる。

微量の酵素活性を見いだすには還元型色素を用いる方がよいので、以後の研究では電子供与体として還元型フェノサフラニン (Ps-H_2) を使用することにした。ウシの他の臓器についても、肝の場合とまったく同じ操作で Ps-H_2 とベンズアルデヒドを電子供与体として見ると、つねに電子供与体として Ps-H_2 の方がすぐれていた (第 9 表)。

3. 阻害実験

動物組織による硝酸の還元が還元型メチレン青やコハク酸-コハク酸脱水素酵素系を電子供与体とすることができないばかりでなく、メチレン青やコハク酸はむしろ阻害的に働いたことはすでに述べた。

ウシの肝の新鮮ホモジネートにシステインを添加して反応を行うと、微量ではあるが亜硝酸の生成量の増加を見ることがあつたが、この作用は不安定であつて、システインはこの場合電子供与体として働くのではなくて酵素の SH 基の保護に役立ったのではないかと考えられた。もしこの酵素活性に SH 基が関与しているとすれば当然 SH 基阻害剤で活性が阻害されるはずである。

このことを確かめるために、ウシの肝の新鮮ホモジ

ネートを酵素液として実験を行った(第10表)。ヨードソベンゾアート, PCMB は共に反応を阻害し, 十分量の還元型グルタチオンを加えると反応は回復した。この場合還元型グルタチオンのみでは反応に影響を与えなかつた。

つぎにシアンによる酵素活性の阻害と金属イオンによる阻害の回復を調べてみた。ウシの肝の新鮮ホモジネートに実験方法のところに述べたようなシアン処理を行つて酵素液とする。この処理を行つた酵素液は処理前の酵素液に比べて強い活性低下があるが, 蒸留水で対照透析を行つた酵素液と比較してもシアンの阻害作用は明らかであつた(第11表)。このシアン処理酵素液にいろいろの金属イオンを添加して反応を行い, 阻害の回復の有無を見ると, 第11表のように Mo が活性の回復をもたらしたが, Fe³⁺ は効果がなかつた。Fe²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Wo も効果はなく, むしろそれらの多くはさらに活性を阻害し

表 11 酵素活性のシアンによる阻害と金属イオンによる回復(ウシ肝)

	終濃度 (M)	阻害率 (%)	回復率 (%)
対照透析酵素		0	(100)
シアン処理酵素 (E)		62.0	0
E + FeCl ₃	2 × 10 ⁻⁴	62.0	0
E + Na ₂ MoO ₄	2 × 10 ⁻⁵	34.2	44.8
E + Na ₂ MoO ₄	1 × 10 ⁻⁴	29.8	52.0
E + Na ₂ MoO ₄	2 × 10 ⁻⁴	24.2	60.9
E + Na ₂ MoO ₄	4 × 10 ⁻⁴	11.3	81.8

酵素乾燥重量 1mg あたりの活性について比較。反応組成: Ps-H₂ 2ml, 酵素液, 緩衝液, KNO₃, 蒸留水各 1ml, 計 6ml。金属塩(中和)を加えるときは蒸留水に溶す。

表 10 SH 基阻害剤の使用(ウシ肝)

	終濃度 (M)	生成亜硝酸量* (μM/L)	阻害率 (%)
ヨードソベンゾアート	10 ⁻³	0.039	64.9
PCMB	10 ⁻³	0.033	70.3
{ヨードソベンゾアート 還元型グルタチオン	10 ⁻³ 2 × 10 ⁻²	0.111	0
{PCMB 還元型グルタチオン	10 ⁻³ 1 × 10 ⁻²	0.111	0
還元型グルタチオン	2 × 10 ⁻²	0.111	0
—		0.111	0

* 酵素乾燥重量 1mg あたり。反応組成 Ps-H₂ 2ml, 酵素液, 緩衝液, KNO₃ 各 1ml に表記試薬(中和)を加えて全量 6ml とする。

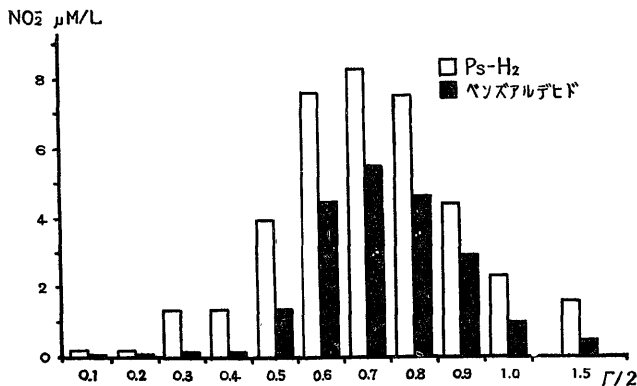
た。結局この酵素の活性中心の少なくとも 1 つは Mo であるらしいと考えられた。

4. リン酸カルシウムゲルによる酵素の分割

粗酵素液のなかには, Ps-H₂ から電子を受けとるがアルデヒドからは受けとらない硝酸還元酵素が存在する可能性がまだ残っている。そこで Ca-P ゲルによる段階的分散吸着法を用いて酵素蛋白の分割精製を行つてみた。

実験材料にはウシの肝を用い, 各イオン強度で溶離したそれぞれの分割について, Ps-H₂ とベンズアルデヒドを電子供与体として活性を調べた。いま各イオン強度の溶離酵素液をそれぞれ 0.1...1.5 分割と略記すると, いずれの場合も第 1 図のように酵素活性は 0.7 分割をピークとする分布を示した。即ち Ps-H₂ とベンズアルデヒドを電子供与体とする硝酸還元酵素は,

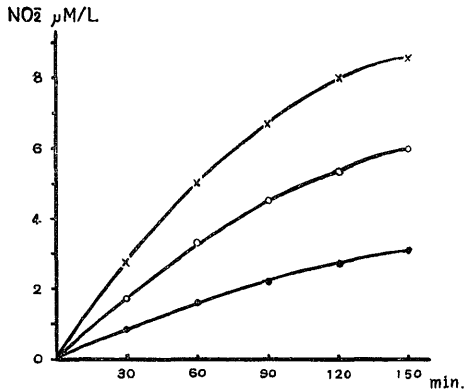
第 1 図 Ca-P ゲルによる酵素分割の活性(ウシ肝)



反応組成: 電子供与体 2ml*, 溶離酵素液, KNO₃, 蒸留水各 1ml, 計 5ml。
*Ps-H₂ 2ml またはベンズアルデヒド, 蒸留水各 1ml。

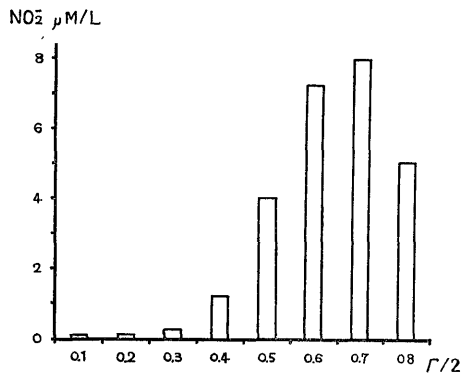
この操作でも分離しない。前に述べた酵素のアルカリ処理を0.7分割について行つてみても、活性は両方の電子供与体に対して同率で低下した。なおここで0.7分割の酵素反応の時間的経過を調べてみると第2図のようになり、また亜硝酸の生成量は反応時間120分までは酵素量によく比例した。

第2図 0.7分割の反応曲線(ウシ肝)

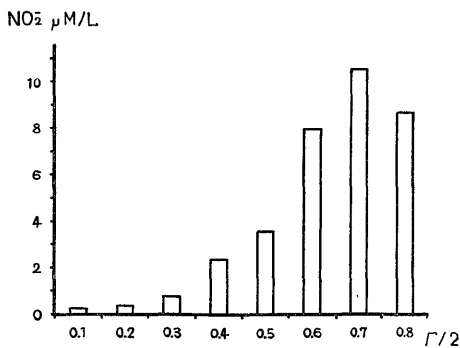


反応組成 : Ps-H₂ 2ml, 溶離酵素液, KNO₃, 蒸留水各 1ml, 計 5ml. 酵素乾燥重量 ; × 2mg, ○ 4/3mg, ● 2/3mg.

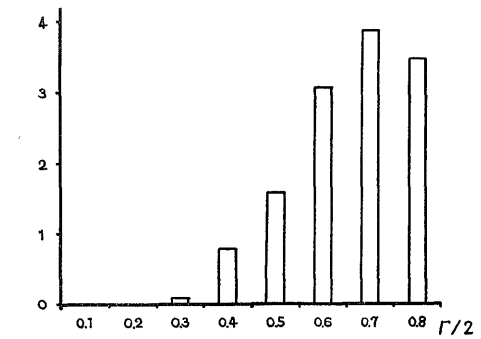
第3図 Ca-P ゲルによる酵素分割の活性
A. ウシ脾



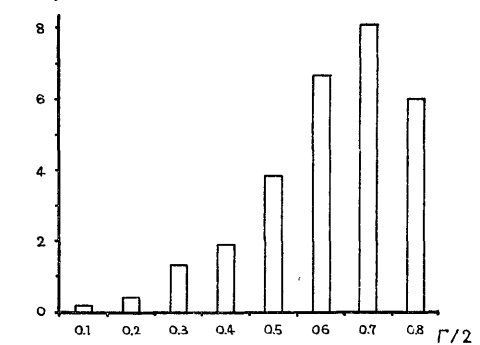
B. ダイコクネズミ肝



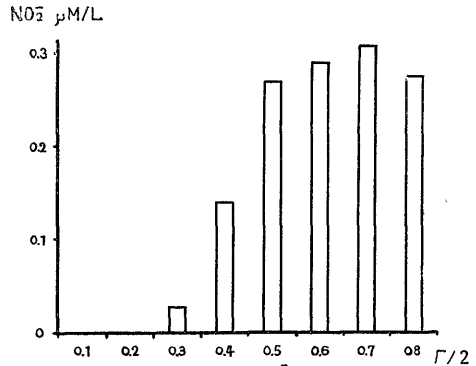
C. ハツカネズミ肝



D. ハツカネズミ肺



E. ヒト胃粘膜



反応組成 (A-E) : Ps-H₂, 溶離酵素液各 2ml, KNO₃ 1ml, 計 5ml.

肝以外の2,3の臓器についてもこの方法によつて分割を行つてみた結果,第3図A-Eのようにいずれもピークは1つであつて0.7分割に最大の活性が認められ,やはりPs-H₂もアルデヒドも共に電子供与体となりうることにちがいがなかつた。

5. Hydroxylapatite によるカラムクロマトグラフィ

ウシの肝を材料として, Ca-P ゲルによる段階的分散吸着法によつて得られた酵素活性のもつとも高い

分割 (0.7 分割) の蛋白を、さらに **Tiselius** の方法²⁷⁾ に従って分割してみた。用いたカラムは直径 1cm, 高さ 8cm で、あらかじめ 10^{-3} M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で緩衝化してから、1 夜流水で透析して塩類を除いた 0.7 分割の蛋白を吸着させ、第 1 表にあげた溶離液で展開する。各イオン強度で溶離してくる蛋白液は 5ml ずつ 10本の試験管に順次分けて取る。

各試験管の蛋白量を 275μ の吸光値で表わした結果の 1 つを示すと第 4 図のようで、いずれの場合も 1 つのピークの見た硝酸還元活性が認められ、この酵素活性は $Ps-H_2$ を電子供与体として単位蛋白重量あたり新鮮ホモジネートの約 50 倍高くなっていた。またアルデヒドを電子供与体としても同じピークのみで硝酸還元が見られた。ただヒポキサンチンを電子供与体とした場合、この酵素液による亜硝酸の生成量は非常に少なかった (第 12 表)。このことは基質 (ヒポキサンチン) の量が不相当であつたのかもしれない²⁸⁾、或いは反応に長い誘導期があるためかもしれない。そこで同じ酵素液を用い、**FAD**, **Mo** を十分添加して **Thunberg** 管でメチレン青の還元を調べてみたが、脱色に 90 分を要する程度で、まず酵素活性を認めがたかつた。

この酵素液の吸収曲線と、シアン処理後のそれは第 5 図のようになった。シアン処理を行つた酵素液では透析中に変性した蛋白が除かれているために蛋白量が減少していることもあつて吸光値は低くなつてはいるが、処理前に $410m\mu$ にあつたピークは $420m\mu$ へ移動し、目立たなくなつた。吸収曲線の $300\sim 500m\mu$ のピークは **Mo** を含むすべての酵素に見いだされるものであつて、²⁹⁾ **Fe** や **Cu** では現われないことが知られているし、^{30) 31)} アルデヒド酸化酵素やキサンチン酸化酵素も **molybdoflavoprotein** であることが知られているから、^{32) 35)} この得られた酵素もまずアルデヒド酸化酵素に一致すると考えることがゆるされるであらう。

さらにこの酵素液を用いてシアン処理を行つてから、金属イオンの添加による活性の回復を見たが、調べられたイオン

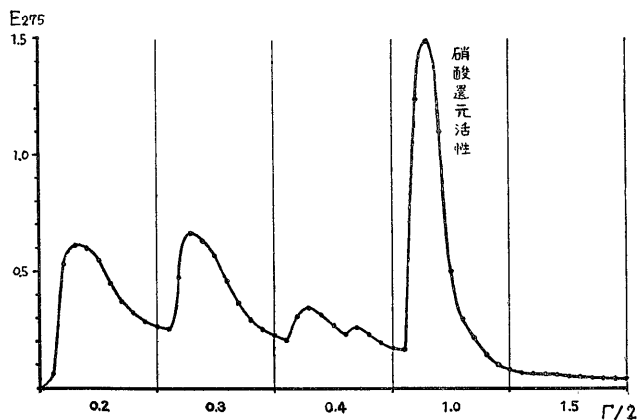
のうち **Mo** のみに回復効果が認められ、**Fe** その他の金属には効果が見られなかつた。

6. 酵素活性の細胞内分布

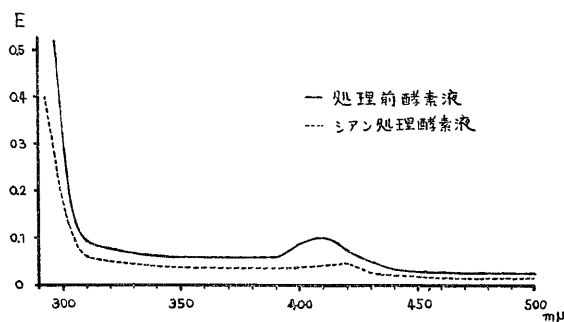
以上に述べた動物の成熟組織において硝酸還元を行う酵素 (アルデヒド酸化酵素) の細胞内分布を調べてみよう。

実験材料としてダイコクネズミの肝を用い、**Schneider** の等張蔗糖液による遠心分別法³⁶⁾ に習つて細

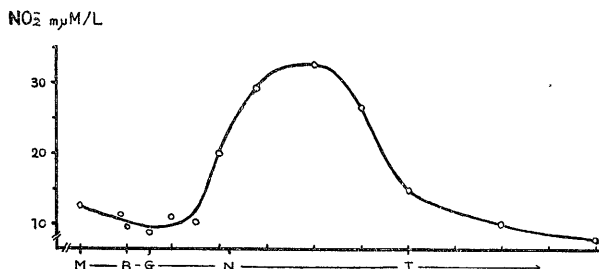
第 4 図 カラムクロマトグラフィーによる酵素の分離 (ウシ肝)



第 5 図 酵素のシアン処理による吸光曲線の変化



第 6 図 モリアオガエル初期発生における硝酸還元の消長 (電子供与体: $Ps-H_2$)



M…桑実期, B…胞胚期, G…囊胚期, N…神経胚期, T…尾蕾期. 生成亜硝酸量は卵 1 コあたり. 反応組成: $Ps-H_2$ 2ml, 酵素液, 緩衝液, KNO_3 各 1ml, 計 5ml.

表 12 各電子供与体による亜硝酸生成量 (ウシ肝)

	生成亜硝酸量 ($\mu\text{M/L/mg/N}$)
Ps-H ₂	190.5
アセトアルデヒド	171.3
ヒポキサンチン	14.2

窒素量はアツオトメリーで測定。反応組成：電子供与体 2ml*, 溶離酵素液, KNO₃, 蒸溜水各 1ml, 計 5ml。*PsH₂; アセトアルデヒド, 蒸溜水各 1ml または 9.1%ヒポキサンチン, 蒸溜水各 1ml,

表 13 酵素活性の細胞内分布 (ダイコグネズミ肝)

	電子供与体	
	Ps-H ₂	アセトマルデヒド
V	100%	100%
Nw ₂	15.1	12.9
Mw ₂	5.9	4.5
Pw ₂	6.6	5.1
S ₂	84.5	71.8

反応組成：電子供与体 2ml*, 酵素液, 緩衝液, KNO₃ 各 1ml, 計 5ml, *Ps-H₂ またはアセトアルデヒド蒸溜水各 1ml.

表 14 シアン処理酵素の金属イオン添加による活性の回復 (モリアオガエル神経胚期胚)

	終濃度 (M)	回復率 (%)
—		0
Na ₂ MoO ₄	2×10^{-4}	32
FeSO ₄	2×10^{-4}	50
FeCl ₃	2×10^{-4}	50
MnSO ₄	2×10^{-4}	0

反応組成：Ps-H₂ 2ml, シアン処理酵素液, 緩衝液, KNO₃, 金属塩 (中和) 各 1ml, 計 6ml.

胞内成分を分けた。Nw₂, Mw₂, Pw₂ は適当量の蔗糖液で分散し, V, S₂ とともにそれぞれ液量を計っておき, その 1ml を用いて各分割の酵素活性を調べてから出発資料の中の活性の分布率を計算した。

第14表はその結果で, 硝酸還元活性は可溶性部分 (S₂) に局在し, Ps-H₂ とアルデヒドのいずれを電子供与体としても活性の局在は全く同じであった。

II. 胚の硝酸還元

教室ではカエルの初期発生におけるいろいろの酵素

の消長について系統的な測定が行われてきたが, その一環として胚の硝酸還元についての知見が得られている。

まず大原, 須山¹²⁾ はモリアオガエルの初期発生中, 一時的にコハク酸-コハク酸脱水素酵素系を電子供与体とする硝酸還元酵素が出現することを見いだした。しかしここで卵膜内の微生物による汚染が疑われたので⁸⁾, 武川¹³⁾ が厳重な無菌の条件の下で再実験を行い, 微量ではあるがやはり胚に硝酸還元酵素が存在することを確かめた。この酵素はコハク酸-コハク酸脱水素酵素系を電子供与体とする点で肝のものとは異なっている。

そこで Ps-H₂ を電子供与体としてその消長をもう一度調べてみた。モリアオガエルの胚を各発生時期ごとに集めて等張塩化カリウム液を加えてホモジナイズし, 1ml について卵20コを含むものを酵素液として測定した結果は第6図のようになった。この結果は武川の測定したものとよく一致する。

ついでこの活性の高い時期 (神経胚期) の胚を多数集めてホモジナイズし, それにすでにのべたようなシアン処理を行って酵素液とし, P₂-₂ を電子供与体として種々の金属イオンの添加による活性の回復を調べてみた (第14表)。

表で示されるようにこの酵素のシアンによる阻害は Fe でよく回復し, Mo にも効果が見られる。この点はこの酵素と前章で述べたアルデヒド酸化酵素との大きなちがいである。ただここで用いられた酵素液は新鮮ホモジネートであるから, アルデヒド酸化酵素の共存することも否定できない。Mo の効果もそのことを支持するようになる。Ps-H₂ はアルデヒド酸化酵素の電子供与体となりえたが, フェノサフランの酸化還元電位はコハク酸脱水素系のそれより低いから, 同時にこの新しい型の硝酸還元酵素にも電子供与体となりえたと考えられる。

この2つの酵素を分ける手段として, 前章で用いた Ca-P ゲルによる段階的分散吸着法を応用してみた。その結果は第7図に示す。ここには明らかに活性のピークが2つ認められる。その1つは成熟動物組織に見られたアルデヒド酸化酵素のピークに等しくイオン強度0.7の分割にあり, アルデヒドを電子供与体とするが, 他の1つは成熟動物組織には見られなかつたものでイオン強度0.2の分割にあり, アルデヒドを電子供与体としない。

さらに0.2と0.7の分割の酵素をそれぞれシアン処理したのち, これらについて金属イオンの作用を調べてみると, 0.2分割は Fe によつて活性が回復するが

Mo では回復せず、一方 0.7 分割は Mo で回復し Fe では回復しなかつた。なお 0.2 分割の酵素活性は PCMB, ヨードソベンゾアート, 窒化ナトリウム, $\alpha\alpha'$ -ジピリジル, o-フェナンスロリンで阻害された。

これらからイオン強度 0.7 の分割をピークとする山はアルデヒド酸化酵素に一致する Mo 蛋白によるものであり、イオン強度 0.2 の分割をピークとする山は SH-Fe 蛋白によるものと考えられる。

カエルの初期発生において、 $Ps-H_2$ を電子供与体として用いたときも、コハク酸-コハク酸脱水素酵素系を用いたときも硝酸還元活性の消長がよく似ていることは、いわゆる肝臓型の硝酸還元酵素（アルデヒド酸化酵素）が鉄型硝酸還元酵素の消長に影響するだけの变化を示さないか、或いはそれと同様の消長を取るためであろう。いずれにせよ初期発生において、一時的にこのような細菌型に近い鉄型硝酸還元酵素が出現することは注目されることである。

III. 腫瘍と再生

前章で胚の発生過程にはアルデヒド酸化酵素とは異なる硝酸還元酵素が出現し、それが Fe-蛋白であるらしいことが明らかになった。胚発生を正常発生とすれば、腫瘍の発生は異常発生としてこれに対比させることができる。そこで種々の癌について調べることにした。

1. エールリッヒ腹水癌

表 15 イオン強度 0.2 分割酵素の重金属試薬による活性阻害 (腹水癌)

	終濃度 (M)	阻害率 (%)
—		0
チオ尿素	10^{-3}	89.0
窒化ナトリウム	10^{-3}	77.9
$\alpha\alpha'$ -ジピリジル	10^{-3}	100
o-フェナンスロリン	10^{-3}	94.6

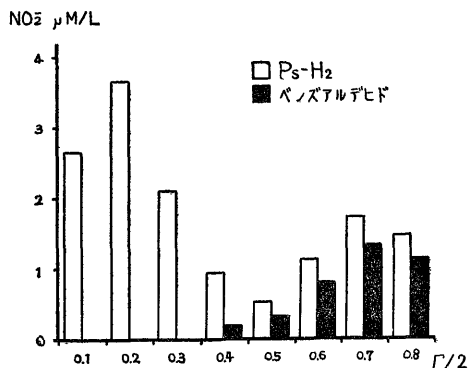
反応組成: $Ps-H_2$ 2ml, 溶離酵素液, KNO_3 , 重金属試薬 (中和) 各 1ml, 計 5ml.

表 16 イオン強度 0.2 分割酵素の CO による活性阻害 (DAB 肝癌)

		阻害率 (%)
—		0
CO (暗)	1 気圧	92.1
CO (明) *	1 気圧	36.4

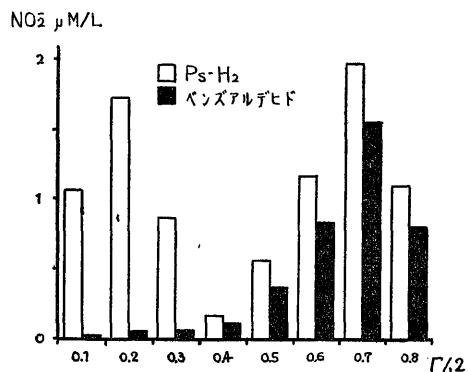
* 200W 電球で 20cm の距離から反応中照射。反応組成: $Ps-H_2$, 溶離酵素液各 2ml, KNO_3 1ml, 計 5ml.

第 7 図 モリアオガエル神経胚期胚の Ca-P ゲルによる酵素分割の活性



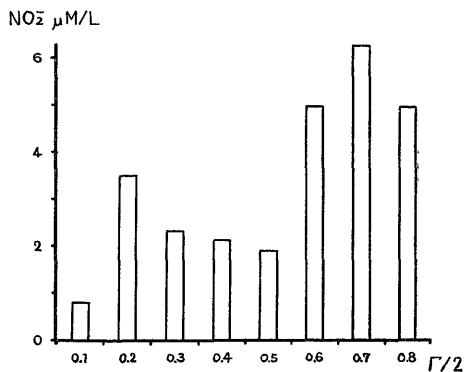
反応組成: 電子供与体 *, 溶離酵素液各 2ml, KNO_3 1ml, 計 5ml. * $Ps-H_2$ またはベンズアルデヒド, 蒸溜水各 1ml.

第 8 図 腹水癌の Ca-P ゲルによる酵素分割の活性



反応組成: 第 7 図と同じ.

第 9 図 DAB 肝癌の Ca-P ゲルによる酵素分割の活性



反応組成: 第 7 図の $Ps-H_2$ を電子供与体とするものと同じ.

d-d 系ハツカネズミにうえつがれているエールリッヒ腹水癌を雑系の腹腔にうえ変え、10日目に生じた腹水を取りだして使用した。この腹水について Ca-P ゲルによる分散吸着法を行い硝酸還元活性を見ると第8図のようになった。これによると胚の場合と同じように、イオン強度 0.2 と 0.7 の2つの分割に P_s-H_2 を電子供与体とする活性のピークが見られ、0.7 分割酵素にはアルデヒドも電子供与体となつたが、0.2 分割の方には電子供与体とはならなかつた。

0.2 分割について2, 3の重金属試薬による酵素活性の阻害効果を調べると、第15表のようにすべて強い阻害作用が現われた。

0.2 と 0.7 の2つの分割酵素をそれぞれシアン処理したのち、金属イオン (終濃度 $2 \times 10^{-4}M$) を添加して活性の回復を見ると、0.2 分割は Fe ($FeSO_4$, $FeCl_3$) で 70~80%回復したが Mo では回復が見られず、0.7 分割は Mo ($Na_2 MoO_4$) で 85%回復したが Fe では回復が見られなかつた。また2つの分割とも Mn^{2+} , W その他の調べられた金属イオンは効果がなかつた。

このような結果は胚の場合と全く同じであつて、結局 0.7 分割酵素はアルデヒド酸化酵素であり、0.2 分割酵素は鉄型硝酸還元酵素と見なされるであろう。なお腹水癌をもつたハツカネズミの他の臓器には、この鉄型の酵素は認められなかつた。

2. ダイコクネズミの DAB 肝癌

ダイコクネズミに P-ジメチルアミノアゾベンゾール (DAB) を小米に 0.06% の割合に混じて与えているといわゆる DAB 肝癌ができる。³⁰⁾ここでは投与開始後6カ月目にこれを取りだして使用した。これに Ca-P ゲルによる分散吸着をほどこし硝酸還元活性を調べると第9図のようになり、 P_s-H_2 を電子供与体とした場合やはり 0.2 と 0.7 の2つの分割に活性のピークが現われた。

0.2 分割酵素について CO ガスの活性への影響を見ると第16表のようで、CO は暗所では酵素活性を強く阻害したが、光をあてると殆んど阻害しなかつた。この結果からこの酵素が活性部分に鉄をもつものであることが一層確実となる。

3. ヒトの癌

外科的に取りだしたヒトの各種の癌に Ca-P ゲルによる分散吸着法を行い、鉄型の硝酸還元酵素の存在を調べてみた。結果は第10図 A-J である。

すべての例を通じてイオン強度 0.2 と 0.7 の2つの分割に硝酸還元活性のピークが見られる。0.7 分割のピークは正常組織におけるアルデヒド酸化酵素による

ものに一致し、0.2 分割のピークは胚やエールリッヒ腹水癌、DAB 肝癌のそれと一致している。すでにのべたようにヒトの正常胃粘膜ではアルデヒド酸化酵素以外の硝酸還元酵素によるピークは見られないから、ヒトの胃癌の 0.2 分割の方の硝酸還元酵素は、癌化という現象に伴つて現われたものにちがいない。

4. ダイコクネズミの再生肝

胚も腫瘍も「短期間の強い細胞増殖という点ではよく似た現象である。これに似たものとして、もう1つ再生現象をあげることができよう。

そこでダイコクネズミの肝に再生を起させて実験した。体重120g 前後の雄を用い、肝を一部外科的に約 400mg 切除し、一定日数後切除部に近く 1.5g 取つて Ca-P ゲルによる分散吸着法を行つた。測定に用いた肝の一部は組織学的にも調べ、再生の有無を確かめた。

P_sH_2 を電子供与体として活性を調べた結果は第11図で、イオン強度 0.2 分割のピークは再生現象のもつとも盛んな14~18日目ごろに認められるが、その前後には見られない。一方 0.7 分割のピークは同じ時期にやや高くなるが消えることはない。再生16日目の肝についてアルデヒドも同時に電子供与体として活性を見ると、0.7 分割には両者とも効果があつたが、0.2 分割にはアルデヒドは電子供与体として作用しなかつた (第12図)。

0.2 分割酵素の活性に対する CO ガスの影響を調べてみると、暗所では強く阻害作用を現わしたが、光をあてると弱くなつた。またこの分割酵素は鉄結合試薬によつても鋭敏に阻害を受けた。

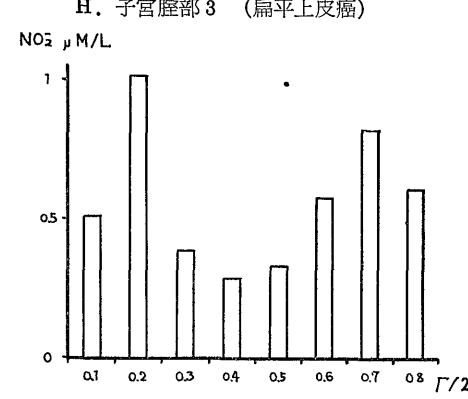
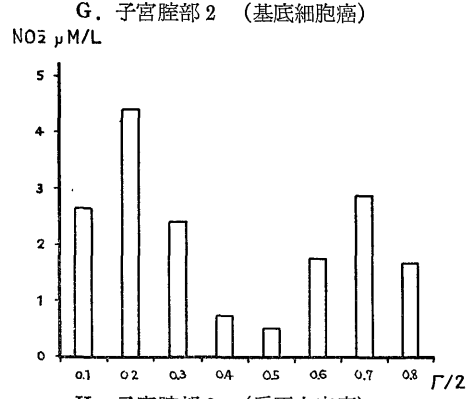
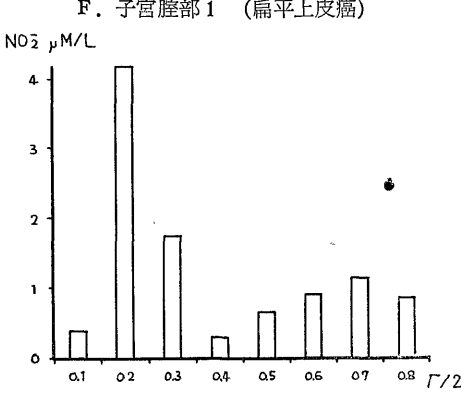
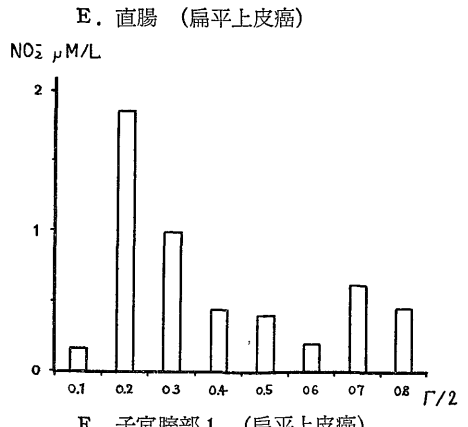
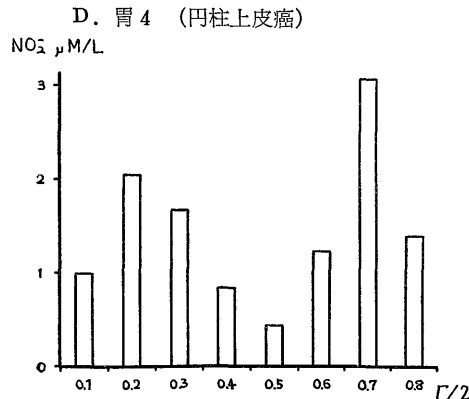
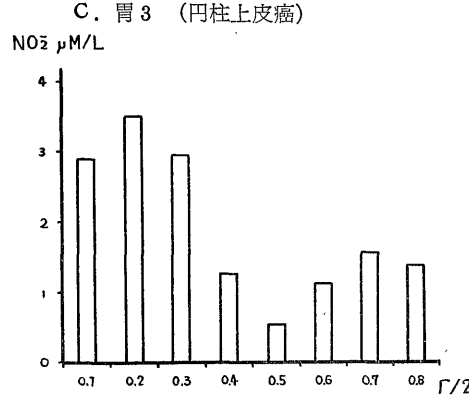
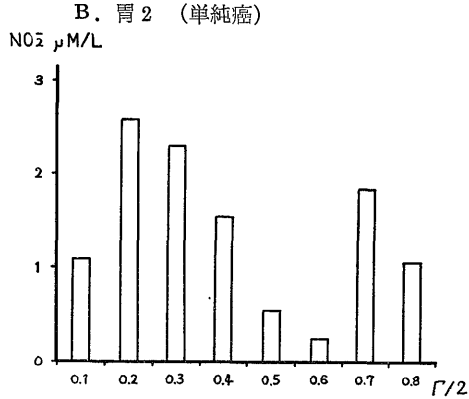
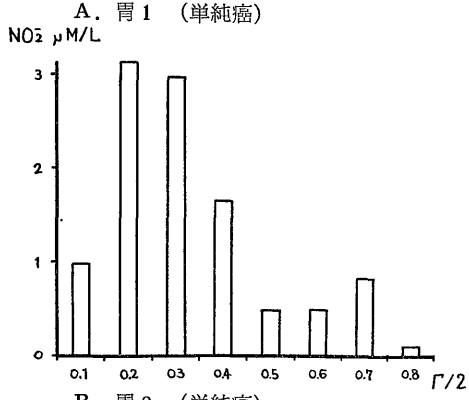
結局再生肝に一時的に出現する 0.2 分割の硝酸還元酵素も、胚や各種の腫瘍に見られる鉄型硝酸還元酵素と差が認められない。

表 17 イオン強度 0.2 分割酵素の阻害実験 (再生肝)

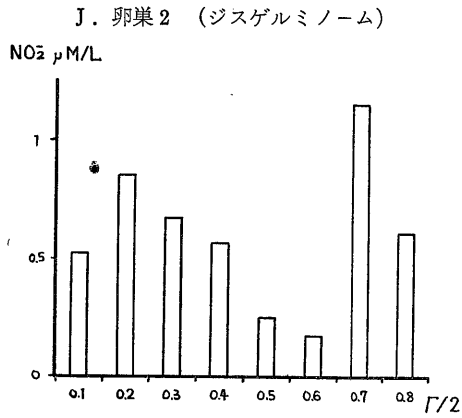
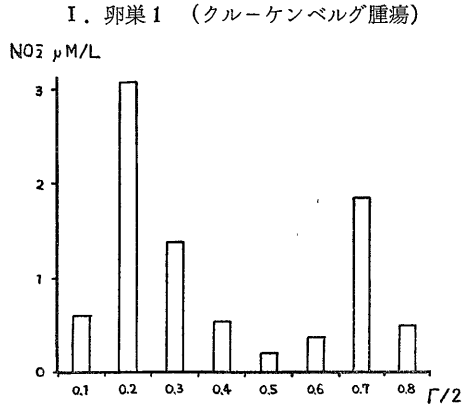
	終濃度 (M)	阻害率 (%)
—		0
CO (暗)	1 気圧	100
CO (明) *	1 気圧	45.2
o-フェナンスロリン	10^{-3}	92.1
$\alpha\alpha'$ -ジピリジル	10^{-3}	90.1

* 200W 電球で 20cm 距離から反応中照射。反応組成: P_s-H_2 , 溶離酵素液各 2ml, KNO_3 1ml, 計 5ml. 重金属試薬を加えるときは計 6ml.

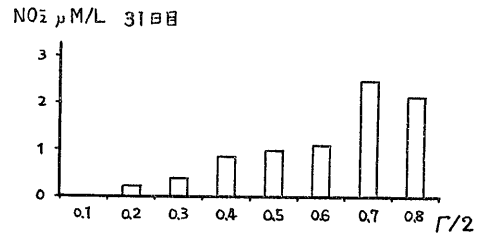
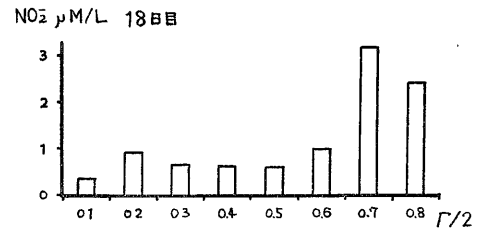
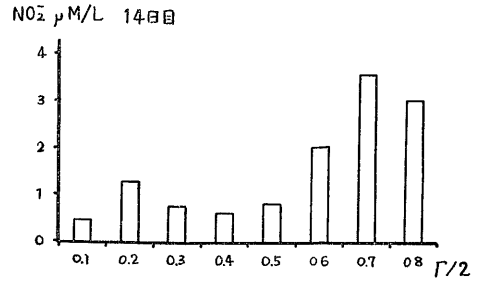
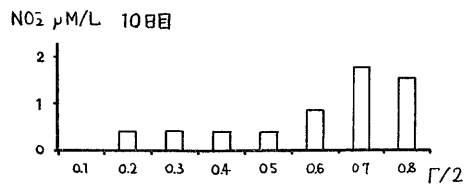
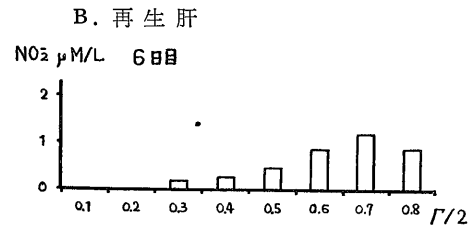
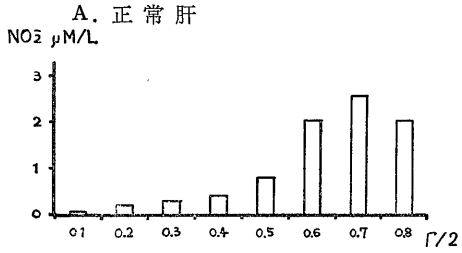
第10図 ヒト癌の Ca-P ゲルによる酵素分割の活性



反応組成 (A-J) : 第9図と同じ。

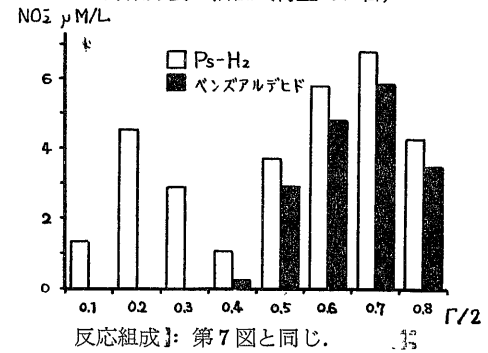


第11図 再生肝のCa-Pゲルによる
分割酵素の活性消長



反応組成 (A, B) : 第9図と同じ。

第12図 再生肝のCa-Pゲルによる
酵素分割の活性 (再生16日目)



反応組成]: 第7図と同じ。

総括

実験に用いた種々の成熟動物組織では、心臓と血液を除いて、硝酸塩を還元する能力が広く存在していた。なかでも肝の活性は強かつた。このような硝酸還元はアルデヒドや還元型フェノサフランインを電子供与体としたが、コハク酸-コハク酸脱水素酵素系や還元型メチレン青を電子供与体となしえなかつた。粗酵素液をリン酸カルシウムゲルによる段階的の分散吸

着法で分けると硝酸還元活性のピークは1つで、イオン強度0.7の溶離液で溶出する蛋白分割にあつた。この分割の蛋白をさらに hydroxylapatite によるカラムクロマトグラフィーで細分してみたが、酵素活性のある蛋白の山は1つしか得られなかつた。この酵素にはアルデヒド酸化酵素活性があつたが、抽出操作または反応系の不備に基づく結果かも知れないとしても、とにかくキサンチン酸化酵素活性は認められなかつた。

また種々の阻害実験を行い、これらの結果から成熟動物組織の硝酸還元は、調べられた限りにおいて、SH-Mo 蛋白であるアルデヒド酸化酵素によつて管まれていることが示された。なおこの酵素の細胞内分布を遠心分別法によつて調べ、これが可溶性部分(S₂)に存在することを知つた。

カエルの初期発生の上にはコハク酸-コハク酸脱水素酵素系を電子供与体とする硝酸還元酵素が現われるが、この酵素のシアン阻害後の金属イオン添加による活性の回復実験、重金属試薬やSH基阻害剤の効果、リン酸カルシウムゲルに対する吸着の態度などから見て、この酵素はアルデヒド酵素とは異なり、鉄とSH基を活性族に持ついわば細菌型に似た硝酸還元酵素であつた。

悪性腫瘍ではエールリッヒ腹水癌、ダイコクネズミのDAB肝癌、ヒトの各種の癌が調べられ、これらにも胚の場合と同じ性質を持つSH-Fe蛋白によつて行われる硝酸還元が見いだされた。またこれと同じ酵素が、ダイコクネズミの肝の再生過程に一過性に現われた。

胚、腫瘍、再生に共通して現われるこの鉄型硝酸還元酵素の意義はどのように理解すればよいであろう。

胚の発生過程における硝酸還元活性のピークは、糖の不完全酸化期(解糖期)と完全酸化期(呼吸期)のそれぞれのピークの現われる胞胚期と尾蕾期の間に見られる³⁷⁾。Needham⁴⁰⁾の化学的反覆説に従い、これが生物進化に伴う代謝形式の変遷を再現しているものと理解すると、硝酸還元(硝酸呼吸)は呼吸より一歩原始的であつて、解糖から呼吸への変換に中間的位置をしめる代謝様式と見なすことができる。

胚の発生を正常発生とすれば、腫瘍は異常発生としてこれに対比され、また再生が一過性であるのに対して、腫瘍は細胞の永続的な先祖帰りであり、未分化性のよく保たれた状態である。そうするとこの鉄型硝酸還元酵素の出現は未分化幼若細胞の増殖に際して共通に見られるということになり、しかもそれは代謝形式の進化様式を再現してみせているものと解釈できよう。

おわりに、御指導御激励下さつた恩師石川教授、協同研究者倉田助教授、武川昭男、岩田卓造両君、材料を御提供下さつた第1外科水上助教授、内田病院、古屋病院各位、種々の御協力をいただいた教室の諸兄に深く感謝します。

文 献

- 1) Quastel, J. H., Stephenson, M., Whetham, M. : *Biochem. J.*, 19, 304 (1925). 2)
- Bernheim, F. : *Biochem. J.*, 22, 344 (1928).
- 3) 佐藤 : 酵素化学の進歩, 第4集, 共立 85 (1954). 4) 谷口 : *生物化学*, 9, 99 (1957).
- 5) Stepanow, A. : *Arch. exp. Path. Pharm.*, 47, 411 (1902). 6) Bach, A. : *Biochem. Z.*, 33, 282 (1911). 7) Dixon, M., Thurlow, S. : *Biochem. J.*, 18, 989 (1924).
- 8) Dixon, M., Thurlow, S. : *Biochem. J.*, 20, 703 (1926). 9) Bernheim, F., Dixon, M. : *Biochem. J.*, 22, 125 (1928). 10)
- Gordon, A. H., Green, D. E., Subrahmanyam, V. : *Biochem. J.*, 34, 764 (1940). 11)
- 丹羽 : 酵素化学シンポジウム, 7, 68 (1952).
- 12) Ohara, M., Suyama, T. : *Nature*, 169, 285 (1952). 13) 武川 : 十全会雑誌本号
- 14) Mahler, H. R., Glenn, J. L. : *Inorganic nitrogen metabolism*, The Johns Hopkins Press 575 (1956). 15)
- Taniguchi, S., Sato, R., Egami, F. : *Inorganic nitrogen metabolism*, The Johns Hopkins Press 87 (1956). 16) Nicholas, D. J. D., Nason, A. : *J. Bacteriol.*, 69, 580 (1955).
- 17) Keilin, D., Hartree, E. F. : *Biochem. J.*, 49, 88 (1951). 18) Singer, T. P., Kearney, E. B. : *Arch. Biochem.*, 29, 190 (1950). 19) Swingle, S. M., Tiselius, A. : *Biochem. J.*, 48, 171 (1951). 20)
- MacIntire, W. H. et al. : *Ind. Eng. Chem.*, 37, 164 (1954). 21) Sarkar, N. K., Sumner, J. B. : *Enzymologia*, 14, 280 (1951).
- 22) *Biochemical preparation*, 2, 18 (1952).
- 23) Nason, A. : *Inorganic nitrogen metabolism*, The Johns Hopkins Press 124 (1956). 24)
- Inorganic synthesis*, 2, 81 (1946). 25)
- Novak, R., Wilson, P. W. : *J. Bact.*, 55, 517 (1948). 26) 奥貫 : 標準生化学実験, 文光堂 395 (1953). 27) Tiselius, A., Hjerten, S., Levin, Ö. : *Arch. Biochem.*, 65, 134 (1956). 28) Hofstee, B. H. J. :

- J. Biol. Chem., 216, 235 (1955). 29)
Westerfeld, W. W., Richert, D. A., Higgin, E. S. : Inorganic nitrogen metabolism, The Johns Hopkins Press 492 (1956). 30)
Mahler, H. R., Sarkar, N. K., Vernon, L. P., Albert, R. A. : J. Biol. Chem., 199, 585 (1952). 31) **Mahler, H. R.** : J. Biol. Chem., 206, 13 (1954). 32) **Mahler, H. R., Mackler, B., Green, D. E., Bock, R. M.** : J. Biol. Chem., 210, 465 (1954). 33)
Green, D. E., Beinert, H. : Biochem. et Biophys. Acta., 11, 599 (1953). 34)
Richert, D. A., Westerfeld, W. W. : J. Biol. Chem., 203, 915 (1953). 35) **Totter, J. R., Burnett, W. T., Jr., Monroe, R. A., Whitney, I. B., Comar, C. L.** : Science, 118, 555 (1953). 36) **Schneider, W. C.** : J. Biol. Chem., 176, 259 (1948).
37) 倉田 : 蛋白質核酸酵素, 1, 32 (1956).
38) 山田その他 : 生命現象の化学 (芦田, 江上, 吉川編), 朝倉 676 (1955). 39) 原田その他 : 大阪医学会雑誌, 36, 783 (1937).
40) **Needham, J.** : Biochemistry and morphogenesis, Cambridge Univ. Press 610 (1942).

Abstract

The reduction of nitrate to nitrite was widely studied in various animal tissues.

The nitrate reducing enzyme in the normal tissue of adult animals was partially purified by the successive batch wise method on calcium phosphate gel and protein chromatography on hydroxylapatite column. This enzyme was aldehyde oxidase.

A new nitrate reducing enzyme was found during embryonic development of the frog. This enzyme reduced anaerobically nitrate to nitrite in the presence of hydrogen donator in the enzyme reaction. This nitrate reductase partially purified showed characteristics as sulfhydryl-iropotein.

The same type enzyme as found in embryo appeared in Ehrlich ascites tumor, DAB-hepatoma of rat and various human carcinoma.

This new enzyme also appeared for a time during the regeneration of a rat liver.