

## Pro-Nitrite Reductase について

附 胚と腫瘍の硝酸一，亜硝酸還元酵素活性

〔金沢大学審査学位論文〕

金沢大学医学部第二病理学教室(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二病理学専攻

武 川 昭 男

(昭和34年4月17日受付)

## 緒 言

初期発生における酵素系変動についての系統的研究の一環を著者は分担して、硝酸一，亜硝酸還元酵素を追求した。

生物体の硝酸の利用は、特に土壤細菌においては19世紀の中期以来よく知られた現象であつた<sup>1)</sup>。Quastelなど(1925年)による特定の関与酵素の指摘、山県(1938年)による *B. coli* よりの硝酸還元酵素の無細胞標品の抽出及びその電子伝達系の模式提出は、この方面のそののちの急速な発展をもたらした。その結果チトクローム  $b_1$  の硝酸還元酵素に対する関与が発見され<sup>2)</sup>、チトクローム系の機能を拡張する契機となつた。このことは呼吸の電子伝達系における  $O_2$  の位置が、嫌気下では硝酸還元酵素の存在下で  $NO_3^-$  で代替されることを意味し、この意味で佐藤・江上<sup>3)</sup>は硝酸還元酵素のこの面の機能を「硝酸呼吸」と呼び、高橋など<sup>4)</sup>は硝酸還元に伴う嫌氣的磷酸化反応を  $P^{32}$  を用いて確認し、上述の提案に支持を与えた。この点からみれば、 $O_2$  への terminal oxidase 系と  $NO_3^-$  への硝酸還元系酵素は、相似の位置をしめると考えることが可能である。蛙胚初期発生について測定された硝酸一，亜硝酸還元酵素活性の消長は、チトクロームオキシダーゼ活性の消長と互いに相反する態度をとり、両酵素の間にならかの関連があることを想像させた。そこで一応両者の酵素蛋白の相互交換の可能性を考えて、このことをモデル実験によつて検討し、否定的結果を得たが、別に pro-nitrite reductase と名づけてもよいと思われる1新蛋白分割の存在を2・3の臓器について確かめることができた。この分割は Green brei のなかにふくまれ、一定濃度の安息香酸ソーダ

処理によつて亜硝酸還元酵素活性を示すものである。

## I. 本研究のいとぐち

教室の大原・須山<sup>5)</sup>はモリアオ蛙胚の幼生までのコハク酸一，乳酸脱水素酵素及び硝酸還元酵素の活性を測定して、前2者の活性極大の間に硝酸還元酵素活性のピークがあることを観察し、発生過程で嫌氣的解糖から呼吸にうつる間に硝酸呼吸の期間があることを暗示した。ところが山田<sup>6)</sup>によつてその硝酸還元酵素活性は卵膜中の微生物によるものではないかとの疑問が出され、その酵素活性が孵化とともに激減するものも卵膜が除かれるためとみなされた。そこでこの問題を再検討するために著者は協同研究者倉田とともに、モリアオ蛙卵及びガマ卵を使用して無菌的にその発生に伴う硝酸一，亜硝酸還元酵素活性及びチトクロームオキシダーゼ活性を測定し、後者の活性曲線と前2者の活性曲線が相反する消長をとることを観察した。さらにこれを確かめるために、被検卵ホモジネートを2つにわけて同時測定も行なつた。なおモリアオ蛙卵には亜硝酸還元酵素活性はないことが確認されたが、ガマ卵には亜硝酸還元酵素活性があり、生成亜硝酸の定量によつて硝酸還元酵素活性を測定することはできない。硝酸の減量による硝酸還元酵素活性測定は硝酸の定量<sup>7)</sup>に時間がかかるので、蛙胚初期発生研究にはあまり適当しておらないから、ガマ卵では亜硝酸の減量を定量して亜硝酸還元酵素活性とした。

**実験1** 蛙胚の硝酸一，亜硝酸還元酵素活性及びチトクロームオキシダーゼ活性測定

実験材料及び方法

被検卵：モリアオ蛙 (*Rhacophrys schlegelii arborea* var *Okada*) 卵及びガマ (*Bufo vulgaris*)

formosus) 卵を、それぞれ金沢市内及び石川県江沼郡山中で採集し、実験室内で飼育し、同腹の胚を 1 系列の測定に継続して用いた。即ち卵の個体差をできるだけ除くために、ガマ卵の場合はその連続した卵紐を、モリアオ蛙卵の場合は 1 コの卵集塊を 1 系列の測定に使用した。胚の発生に伴う諸種の変動を測定する場合、同腹の胚を用いることは、特に必要である。

滅菌：すべてのガラス器具（ツンベルグ管、ワールブルグ検圧計反応容器、Potter-Elvehjem ガラスホモジナイザー、ピペットなど）及びピンセット類は乾熱滅菌し、試薬及びグリースは 100°C 30 分の湿熱を加え、被検卵はゲラチン膜を除去し滅菌 Holtfreter 液で洗滌後、70% アルコールに約 20 秒浸し直ちに滅菌 Holtfreter 液で再洗滌した。

酵素標品：上記滅菌卵に滅菌蒸留水或いは  $\frac{M}{5}$  磷酸緩衝液 (pH 7.2) を加え、ガラスホモジナイザーで氷冷下 3 分間均質化し、これを酵素標品とした。

反応条件及び測定方法：

(1) (2) とともに真空ポンプで 2 分間減圧し、37°C の恒温水槽中で 5 分間予浸後両室の反応液を混合し、2 ないし 2.5 時間反応させた。使用した硫酸ジヒドロストレプトマイシン及びペニシリン G には NO<sub>2</sub> の反応のないことを予め確かめた。反応後飽和醋酸ウラニウム水溶液 3ml. を加えて除蛋白し、遠心 3000 回 10 分間の上清 4ml. をとり、Grieff-Ilosvay 試薬 2ml. を加えて 10 分後 NO<sub>2</sub> の量を日立光電比色計 EPO-A 型 (フィルター BG) または日立分光光度計 EPB-U

型 (波長 520m $\mu$ ) を用い比色定量した。対照には反応時間 0 分のものを用いた。(第 1 表参照)

Grieff-Ilosvay 試薬：A 液。スルファニル酸 10.5g と醋酸ソーダ 6.8g を 300ml の氷醋酸と 600ml の蒸留水に溶かし、3 分間煮沸し 1 $l$  に薄める。B 液。1 $l$  の煮沸水に 5g の  $\alpha$ -ナフチルアミンを加え、5 分間煮沸を続け熱時濾過する。冷後約 5ml の濃塩酸を加えて沈澱を溶かす。AB とともに褐色瓶に貯え、使用時等量に混合する。最大発色は常温で 10~30 分間である。

基準曲線：特級亜硝酸ソーダをガラス器による再蒸留水より 3 回再結晶を繰返し、真空中苛性ソーダ上で一定量を示すまで乾燥したものを秤量し、これを蒸留水で段階稀釈して基準曲線を作った。NO<sub>2</sub> の濃度 5 $\mu$ g/4ml. 以下直線となるから、試料はこの範囲にして測定した。

(3) チトクロームオキシダーゼ活性測定法ワールブルグ検圧計を用い、還元チトクローム C の酸化速度を酸素吸収により測定した。中央カップに 20% KOH 0.2ml. 反応温度 37°C、ガス腔は空気、予浸 10 分間、主室副室反応液混合後 5 分間隔で 40 分間測定し、活性は 10 分間 4 回の平均 Q<sub>02</sub>/卵 1 コをもつて示した。対照は 5 分間卵 ホモジネートを 100°C に加熱したのものを用いた。

(1) (2) (3) の測定結果は第 1 図及び第 2 図に示される。

実験 2 エーリッヒ腹水癌における硝酸還元酵素活

第 1 表 実験 1 の反応液組成 (1) 亜硝酸還元酵素活性測定法 (ガマ卵)

反応組成	ツンベルグ管主室	副室
	15個/ml. 卵ホモジネート(水) 2.0ml.	1.2mg/dl NaNO <sub>2</sub> 0.5ml.
	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5	0.8M コハク酸ソーダ 0.5
	硫酸ジヒドロストレプトマイシン } 各 200~300 $\mu$ M	蒸留水 0.5
	ペニシリン G }	

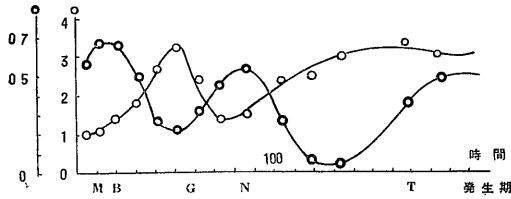
(2) 硝酸還元酵素活性測定法 (モリアオ蛙卵)

反応組成	ツンベルグ管主室	副室
	15個/ml. 卵ホモジネート(水) 2.0ml.	0.08M KNO <sub>3</sub> 0.5ml.
	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5	0.8M コハク酸ソーダ 0.5
	硫酸ジヒドロストレプトマイシン } 各 200~300 $\mu$ M	蒸留水 0.5
	ペニシリン G }	

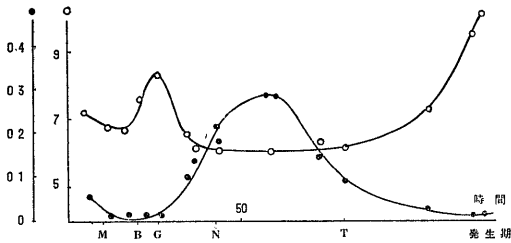
(3) チトクロームオキシダーゼ活性測定

反 応 組 成	主 室	副 室
20個/ml. 卵ホモジネート (上記緩衝液)	1.0ml	13mg/2ml. ハイドロキノ 0.4ml
10 <sup>-4</sup> M チトクローム C	0.5	

第1図 ガマ胚初期発生における亜硝酸還元酵素とチトクロームオキシダーゼの活性



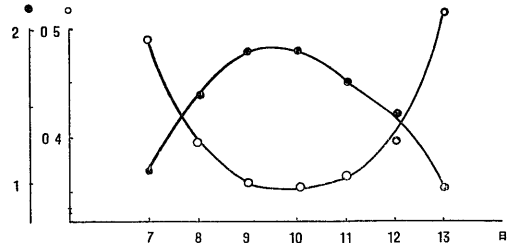
第2図 [モリアオ蛙胚初期発生における硝酸還元酵素とチトクロームオキシダーゼの活性



M : Morula, B : Blastula, G : Gastrula  
N : Neurula, T : Tailbud

- チトクローム酸化酵素活性  $QO_2/10分/卵1個$
- 亜硝酸還元酵素活性 消失  $NO_2 \mu M/L/2時間/30個卵$
- 硝酸還元酵素活性 生成  $NO_2 \mu M/L/2.5時間/30個卵$

第3図 エーリッモ腹水癌の硝酸還元酵素とチトクローム酸化酵素活性の経日変化



- チトクローム酸化酵素活性  $QO_2/10分/10mg$  乾燥重量
- 硝酸還元酵素活性 生成  $NO_2 \mu M/時間/10mg$  乾燥重量

性とチトクロームオキシダーゼ活性測定

実験材料と方法

dd系マウス(体重20g前後)の腹腔内にエーリッモ腹水に等量の滅菌生理食塩水を加えたもの0.1ml宛注入し、接種後7日目より13日目の各腹水を使用した。個体差を少なくするために、1回の測定に4~6匹のマウス腹水を混合した。

酵素標品：上記腹水に等量の $\frac{M}{5}$ 磷酸緩衝液(pH 7.2)を加え、氷冷下3分間ホモジナイズしたものを酵素標品とした。測定は硝酸還元酵素及びチトクロームオキシダーゼについて各々 duplicate に行なった。なおエーリッモ腹水癌には亜硝酸還元酵素活性は認められないことを確かめた。反応液組成は第5表の通りで、測定方法は実験1と同じである。

対照は反応時間5分を使用した。反応時間は60分とした。

実験結果は第3図に示される。活性は酵素標品の乾燥重量を基準にして示した。

なお蛙胚やエーリッモ腹水癌にある硝酸還元酵素はアルデヒド(アセトアルデヒド、クロトンアルデヒド)、キサンチンを水素供与体になし得ず、コハク酸、グルタミン酸、ピルビン酸を水素供与体とする。また微量のメチレン青(0.05%メチレン青を反応液組成中の蒸溜水と代置する)でその活性が平均1.19倍に促進された。

これらの点で肝臓型の硝酸還元でなく、細菌型のそれに近いことがわかつた<sup>9)</sup>。

考察並びに小括

1. 無菌条件で得られた硝酸還元酵素活性が、大原・須山の実験結果にくらべてはるかに低いことからみると、彼等の実験に細菌汚染がなかつたとはいきれないが、やはりまちがいがなくモリアオ蛙胚に微弱ながら硝酸還元酵素活性がある。また酵素活性が孵化以前にすでに低下することも卵膜の細菌との無関係を示している。これらの微弱な酵素活性が胚の発生に重要な機能を果しているとは考えられないが、系統発生的

第2表 実験2の反応液組成 (1) 硝酸還元酵素活性測定

ツンベルグ管主室		副室	
腹水ホモジネート	1.0ml.	$\frac{M}{2}$ KNO <sub>3</sub>	1.0ml.
$\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	1.0	$\frac{M}{2}$ コハク酸ソーダ	1.0
硫酸ジヒドロストレプトマイシン	各200~300 $\mu$ M	蒸溜水	1.0
ペニシリンG			

## (2) チトクロームオキシダーゼ活性測定

ワールブルグ検圧計容器主室		副 室	
腹水ホモジネート	1.0ml.	13mg/2ml. ハイドロキノン	0.4ml.
$10^{-4}M$ チトクロームC	0.5		

中央カップに 20% KOH 0.2ml. 対照は腹水ホモジネートを 5 分間 100°C 加熱したものを使用。

にはその出現は興味深い。生物が硝酸環境から酸素環境へ変遷の間にたどった系統発生的進化の過程が、個体発生に際しても繰返されるという Needham の **chemical recapitulation**<sup>10)</sup> という考えがこの場合都合のよい説明を与えるだろう。

2. 胚の発生を正常発生とするならば、悪性腫瘍は異常発生と考えられるが、いま個体内における調節という問題を無視すれば、両者の間には近似性が求められるはずである。そこで後者についても硝酸還元酵素の活性が測定され、実験 2 に示されるようにチトクローム酸化酵素活性と相反して消長する活性曲線を得たのである。このような結果から硝酸還元系酵素は細胞の初期発生に共通して出現するものであつて、しかもこの酵素の出現は、終末呼吸酵素であるチトクローム酸化酵素の消長となんらかの関係をもっているように思われた。両酵素は機能的にも類似しているのだが、酵素蛋白の構造上にも一面の類似性があるらしいのである<sup>11)-16)</sup>。発生過程における両者の活性の相反性は或いは単なる偶発的現象かもしれないし、或いは好氣的呼吸と硝酸呼吸のせり合い現象を示したものかもしれない。しかしわれわれは飛躍的ではあるが、ここに 1 つの推測を立てた。即ち少なくとも発生過程においては硝酸還元系酵素蛋白がチトクローム酸化酵素蛋白形成の素材となつているのではなからうかと。もしそうなら試験管内で後者を前者になんらかの人工的手段で転換させることはできないだろうか。より低次の蛋白と考えられる前者を、より高次のものと考えられる後者に試験管内で転換させるのは、当然より困難であ

ろうから、その逆を検討してみることにした。

## II. Green brei を用いての実験

前述の推論に従つて実験を進めるにあつて、すぐ精製チトクローム酸化酵素を用いる前に、その粗標品として Green brei を用い、これを試験管内で化学的に modify することによつて硝酸還元酵素能または亜硝酸還元酵素能が出現するか否かを調べてみた。

**実験 3** Green brei の化学的修飾による硝酸還元酵素活性出現の有無

**Green brei** : 牛心を屠場より氷冷して運搬し、直ちに D. E Green ら<sup>17)</sup>の方法でいわゆる Green brei を調整し、すぐ使用した。brei の量は乾燥重量で表わす。

**トリプシン** : トリプシリン (持田製薬) を使用した。教室白崎君の好意による検定ではその 10000 HUM は 8000 [PU] カゼイン 280m $\mu$   $\gamma$  チロジン 30°C に相当する。

**実験操作** : 短時間内に多数の測定を行なう必要がある場合には、パラジウム触媒を用いて嫌氣的につくるロイコメチレン青<sup>18)</sup>を水素供与体として用いる方法は能率がよくないので、著者は Green brei をコハク酸、メチレン青とともにツンベルグ管副室に加え水素供与体とすることにした。副室内ではメチレン青は Green brei に含まれるコハク酸脱水素酵素により還元されてロイコ型になり、水素供与体となるわけである。

反応液組成は下のようになる。

第 3 表 実験 3 の反応液組成

ツンベルグ管主室		副 室	
Green brei	0.5ml.	Green brei	0.5ml.
0.08~0.5M KNO <sub>3</sub>	0.5	0.02% メチレン青	0.5
$\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	1.0	1M コハク酸ソーダ	0.2
*変性剤	1.0		

\* トリプシン 1000HUM/ml., サルチル酸ソーダ 0.5, 1.0, 1.5, 2.5M, 安息香酸ソーダ 0.5, 1.0, 1.5, 2.5M

第4表 実験4の反応液組成の1例

ツンベルグ管主室		副室	
Green brei	0.5ml.	Green brei	0.2ml.
1mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.1% メチレン青	0.2
$\frac{M}{20}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	1.0	0.5M コハク酸ソーダ	0.1
1M 安息香酸ソーダ	0.5		

第5表

実験番号	消失 NO <sub>2</sub> m <sup>3</sup> /M/時間/mg乾量
1	1.50
2	1.48
3	1.02
4	0.197
5	0.282
6	0.143
7	1.01
8	1.56
9	1.20
10	0.597
11	0.250
12	0.370
13	0.450
14	0.230
15	0.170
16	0.197
17	0.235
18	0.177
19	0.235
20	0.10
21	0.820
平均	0.58

反応はすべてツンベルグ管を用いて嫌気的に行なう、反応時間は主室・副室内容混合前5分～1時間45分（この間に主室で Green brei の変性が起り、副室

では水素供与体の形成が行なわれる）、混合後2時間～3時間半、反応温度は37°C、反応pHは7.4±1で行なつた。反応はワールブルグ検圧計の恒温水槽中にツンベルグ管をその頭部までひたして行なつた。反応終了後飽和醋酸ウラニウム水溶液で除蛋白し、約20mgの活性炭を加えて、3000回10分間の遠心上清を適当に希釈したものについて、NO<sub>2</sub>量を既述のように分光光度計（波長520mμ）を用いて比色定量した。対照は反応時間0分を使用した。使用した活性炭にはNO<sub>2</sub>の反応はないことを確かめた。なお使用ピペットはすべて対照とその本試験について同一のものを使用することによつてピペット誤差をなくした。即ち対照測定に用いたピペットを洗滌して再び本試験に使用した。とりあつかうNO<sub>2</sub>量の変動が微量であるから、測定誤差に対しつねに最大の注意がはらわれねばならないのである。

実験結果：Green breiの標品11種について、種々の濃度のトリプシン、サルチル酸ソーダ、安息香酸ソーダを用いて変性を起させ、硝酸還元酵素活性出現の有無を測定したが、結果はすべて陰性であつた。

実験4 Green breiの化学的修飾による亜硝酸還元酵素活性出現の有無

ついでGreen breiを安息香酸ソーダを用いて変性させ、亜硝酸還元酵素活性が出現するかどうかを調べた。（上表参照）

対照はそれぞれの反応時間0分を使用した。安息香酸ソーダ未処理系に亜硝酸還元酵素活性のないことをその都度確かめた。なお反応系よりGreen breiを除

第6表

阻 害 剤	作用濃度	% 阻 害	備 考
P-Chloromercuribenzoate	$2.27 \times 10^{-3}M$	100	中和して添加
KCN	$3.3 \times 10^{-2}$	15.8	
o-Iodosobenzoic acid	$4.4 \times 10^{-3}$	100	
$\alpha, \alpha'$ -dipyridyl	$4.4 \times 10^{-3}$	30	
o-phenanthroline	$4.4 \times 10^{-3}$	47.5	
CO (dark)	1 atm.	90	
CO (light)	1 atm.	90	

いて同様の反応を行ない、非酵素的な亜硝酸の減少が認められないことを確認した。

結果は第5表のように20回以上の実験を通して、実験の都度新製した Green brei につき 0.10~1.56  $\mu\text{M}$ /時間/mg 乾燥重量の範囲で  $\text{NO}_2$  の減量を認めることができた。なお Green brei を  $100^\circ\text{C}$  5分間加熱したものについて同様な実験を行なった場合には全く亜硝酸還元酵素活性は現われなかった。

#### 実験5 亜硝酸消失に対する阻害実験

実験4で認められた亜硝酸の消費について、種々の酵素阻害剤の及ぼす効果を調べた。結果は第6表に示される。

いずれの場合も反応中メチレン青は完全にロイコ型を示し、阻害が水素供与体の不足によるものでないことは明らかであった。CO 阻害実験はつぎのように行なった。即ち CO 発生装置<sup>19)</sup>より導いた酸素を含まない CO を、3方コックを使用し、反応系を完備して減圧されたツンベルグ管中に徐々に導いて平圧にし、内容を振盪したのち再び減圧・再充填した。暗黒実験はツンベルグ管を暗黒紙で包み、光照射は 200W のタングステン電球を用い、20cm の距離で行なった。光の照射による局部的熱の発生は恒温槽に攪拌器を使用して防止した。

#### 実験6 水素供与体の吟味（副室の条件）

副室に用意された水素供与体系が実際に作用しているかどうかするため、その組成を第7表のようにかえて反応を行ない、第8表に示す結果を得た。

対照はそれぞれの反応時間0分を用い、反応時間は主室副室混合前30分、混合後3時間30分とした。

#### 実験7 至適安息香酸ソーダ濃度の決定

Green brei より亜硝酸還元酵素活性を発現させる安息香酸ソーダの至適濃度を決定するために、加える安息香酸ソーダ濃度を第9表のようにかえてその活性を測定し、第10表に示す結果を得た。

対照にはそれぞれの反応時間0分のものを用い、反応時間は主室副室混合前1時間45分、混合後2時間30分・ $37^\circ\text{C}$  に incubate した。

#### 実験8 安息香酸ソーダによるチトクローム酸化酵素の活性変化

安息香酸ソーダ処理によつて Green brei のチトクローム酸化酵素活性がどのように変るかを調べてみた。まず各濃度の安息香酸ソーダを加えて、主室・副室内容混合前1時間45分、混合後2時間30分、 $37^\circ\text{C}$  に incubate したのち、その反応液の各 1ml. をとつてチトクローム酸化酵素活性を測定した。反応液組成はつぎのようで、チトクローム酸化酵素活性測定法は実験2の(2)と同じである。

この結果及び同時に測定した亜硝酸還元酵素活性を

第7表 実験6の反応液組成

反応組成	ツンベルグ管主室	副室
1	Green brei 0.5ml.	① Green brei 0.2ml.
	1mg/dl $\text{NaNO}_2$ 0.5	② 0.05% メチレン青 0.2
	$\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.5	③ 0.5M コハク酸ソーダ 0.1
	1M 安息香酸ソーダ 0.5	
2	同上	② のかわりに蒸溜水 0.2
3	同上	③ のかわりに蒸溜水 0.1
4	同上	②及び③のかわりに蒸溜水 0.3
備考	使用 Green brei は共通	

第8表

反応系	亜硝酸還元酵素活性	吸光値の差	備考
完全系	100%とする	0.00656	メチレン青脱色
メチレン青欠除系	66.5	0.00436	——
コハク酸ソーダ欠除系	66.5	0.00436	メチレン青わずかに脱色
メチレン青コハク酸ソーダ欠除系	53.2	0.00349	——

第9表 実験7の反応液組成

安息香酸ソーダ主室内 終濃度	ツンベルグ管主室		副室	
0	① Green brei	0.5ml.	Green brei	0.5ml.
	② 1.2mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.02% メチレン青	0.5
	③ $\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	2.0	1M コハク酸ソーダ	0.2
0.16M	③ のかわりに 1M 安息香酸ソーダ 上記磷酸緩衝液	0.5 1.5	同	上
0.6M	③ のかわりに 1M 安息香酸ソーダ(上記緩衝溶液)	2.0	同	上
1.6M	③ のかわりに 2.5M 安息香酸ソーダ(上記緩衝溶液)	2.0	同	上
備考	使用 Green brei は共通			

第10表 亜硝酸還元酵素活性出現と安息香酸ソーダ濃度

安息香酸ソーダ主室内 終濃度 (Mol)	亜硝酸還元酵素活性 (消失 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> m $\mu$ M/時間/mg 乾燥量)
0	0.00
0.16 (0.12) *	0.143
0.6 (0.48) *	0.197
1.6 (1.2) *	0.00

\* ( ) 内は主・副室内内容混合後の濃度

第11表 実験8の反応液組成

管番号	ツンベルグ管主室		副室		備考
1	① Green brei	0.5ml.	Green brei	0.5ml.	使用 Green brei は共通
	② 8.9mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.02% メチレン青	0.5	
	③ $\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	2.0	1M コハク酸ソーダ	0.2	
2	③ のかわりに 1M 安息香酸ソーダ 上記緩衝液	0.5 1.5	同	上	
3	③ のかわりに 1M 安息香酸ソーダ (上記緩衝溶液)	2.0	同	上	
4	③ のかわりに 2.5M 安息香酸ソーダ (上記緩衝液)	2.0	同	上	

第12表

管番号	安息香酸ソーダ 終濃度 (Mol)	チトクローム酸化酵素活性 Qo <sub>2</sub> /10分/mg 乾燥量	消失 NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> m $\mu$ M/時間/mg 乾燥量 亜硝酸還元酵素活性
1	0	3.01	0
2	0.12	2.22	0.205
3	0.48	0.083	0.282
4	1.2	0.000	0

第12表に示す。

#### 実験 9 超音波と尿素の効果

Green brei に含まれる細胞顆粒をこわすことにより亜硝酸還元酵素活性が現われるかどうかを調べるため、Green brei を超音波で処理した。超音波発生装置は久保田製音波発生装置 KMS-100 型を用い、曝射条件は 10KC/秒 (100V, 200mA) の音波を 30 分 + 20 分与えた。液量は Green brei の 20ml で、温度は 18°C を保たせた。この処理をした Green brei は、そのままで反応を行なつても亜硝酸還元酵素活性を全く現わさなかつた。

安息香酸ソーダのかわりに最も代表的な蛋白変性剤としてしられている尿素の効果を検討した。同濃度 (0.125M) では、安息香酸ソーダを用いた場合の 90% の亜硝酸消費がみられた。

#### 考察並びに小括

1. 実験 3 で行なわれた条件に関するかぎりでは、Green brei の安息香酸ソーダ処理によつて硝酸から亜硝酸の生成はみられなかつたのに対して、添加した亜硝酸の消失が認められた。このような亜硝酸消失が酵素反応によるものであることは、実験 4 ~ 8 のデータから認められるであろう。その活性が微弱なことは、それが native のものでないこと、安息香酸ソーダという 1 種の一般酵素阻害剤と共存させて反応していることなどを考慮すれば当然と考えてよいであろう。この現象が亜硝酸定量誤差によるものでないことは、できるだけ誤差源の排除による反復実験から明らかである。反応時間の比較的長いことは、この酵素反応が迷入した細菌の汚染によるものではないかという問題を提起する。この問題は初めから予想されたから、使用試薬でその可能なものは、使用の都度 100°C 30 分間の湿熱を加え、ガラス器具は 150°C 3 時間の乾熱を加えて細菌の汚染を防止した。但し Green brei 自体は滅菌することができないが、しかしこの反応が細菌の汚染によるものでないことはつぎの諸点で明らかと考えられる。即ち (1) 常に同時に行なわれている未処理系に亜硝酸還元酵素活性が認められない。常に偶発的に安息香酸ソーダによる処理系にのみ細菌の汚染があつたとは考えられない。(2) 安息香酸ソーダはそれ自体弱いながらも防腐剤としての効果がある。(3) 至適安息香酸ソーダ濃度が存在する。(4) V に述べる分割実験の示す事実。(5) 成績は clear cut で再現性に富んでいる。

2. 阻害実験の結果は、阻害が Green brei 中の素材蛋白に働いたものか、生成した亜硝酸還元酵素に働

いたものかは不明としても、素材蛋白或いは生成酵素が、その蛋白活性基に -SH 基を有し、かつ作用基に重金属を保有する性状のものであることを暗示する。これは細菌を対象としている他の研究者<sup>3) 15)</sup>の亜硝酸還元酵素のデータによく一致する。ただ KCN の阻害度が比較的低いのは、おそらく減圧操作のために反応液中の KCN (中性化されてある) 濃度が低下し、所期濃度を保持できないためかもしれない。CO では充分の阻害がみられる。ただ CO 阻害は光によつて回復しなかつたので、活性にあずかる金属が鉄であるという積極的根拠<sup>20) 21)</sup>は細菌の合と同じように得られなかつ<sup>15)</sup>。

3. 実験 6 により副室内の水素供与体系は、各々その作用を発揮していることがわかる。メチレン青は Green brei のコハク酸脱水素能の指標をかねて与えたものであつたが、副室内で作られたロイコメチレン青も水素供与体として作用していることは実験 6 から明らかである。即ちここに生成した亜硝酸還元酵素は、コハク酸脱水素酵素を通してコハク酸から、またロイコメチレン青から水素を受けとることができる。この点ではこの酵素は、細菌型さらには胚型のそれに近いことが暗示される。

4. ここで、Green brei に含まれる顆粒系が安息香酸ソーダによる破壊により、本来その内部に含まれていた酵素の遊離によつて本酵素活性が生じたものではないかという疑問が提起される。もしそうであればこれまでにもみられた現象は本質的には蛋白変換の問題としての意義はない。この問題に対しては実験 9 の超音波曝射の陰性結果、さらに決定的には V に述べる細胞顆粒系分割実験が明快にその可能性を否定するであろう。

以上のように、この反応は Green brei の蛋白が安息香酸ソーダによつて化学的に修飾をうけて亜硝酸還元酵素活性を現わすことによるものと考えられるようになったが、ではその Green brei に含まれる蛋白が既知の酵素、たとえばチトクローム酸化酵素、DPN-チトクローム C 還元酵素などであるのか、或いはそれ以外の蛋白であるのかを明らかにするのがつぎの問題となつた。

### III. チトクローム酸化酵素及び Keilin-Hartree 酸化酵素を用いての実験

#### 実験材料及び方法

Keilin-Hartree (以下 K-H) 酸化酵素：牛心より Wainio ら<sup>22)</sup>の方法により K-H 酸化酵素<sup>23)</sup>を作製し、3 回等電点沈澱は Hawthorne & Harrison<sup>24)</sup>



の方法を Eichel & Wainio<sup>25)</sup> の記載に従って行なった。

チトクローム酸化酵素： Eichel ら<sup>12)</sup> の方法に従って、K-H 酸化酵素の3回等電点沈澱より出発し、チトクローム酸化酵素の標品(0-4)及び標品(2-3)<sup>12)</sup> を作製した。得られた標品(2-3)について、その酸化型における416m $\mu$ 及び595m $\mu$ の波長吸収のピークを Eichel らの記載に従って確認した<sup>12)</sup>。

ロイコフェノサフラニン：得られたチトクローム酸化酵素は、コハク酸脱水素酵素を含まないので、水素供与体としてロイコフェノサフラニンを実験の1部

では使用した。これはフェノサフラニンをツンベルグ管副室内で減圧下、ハイドロサルファイトにより還元して作製した。

超遠心器：Phywe 製超遠心器を使用した。

真空凍結乾燥：共和式真空冷凍乾燥機 RL-500 型を使用して行なった。

実験10 チトクローム酸化酵素標品(0-4)を用いての実験

標品(0-4)の真空凍結乾燥標品を乾燥重量50.5 mg/ml. になるとく  $\frac{M}{10}$  磷酸緩衝液(pH 7.4)に溶かし酵素標品とした。

第13表 実験10の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室		副室	
未処理系	① 標品(0-4)	0.5ml.	0.01% フェノサフラニン	0.5ml.
	② 5mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	1mg/ml Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> 液	0.5
	③ $\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液(pH 7.4)	2.0	(上記緩衝液)	
処理系	③ のかわりに 安息香酸ソーダ(上記緩衝液)		同	上

第14表 実験11の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室		副室	
未処理系	標品(2-3)	0.5ml.	K-H 酸化酵素	0.1ml.
	1mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.05% メチレン青	0.2
	アデノフラビン(武田)	0.1	0.5M コハク酸ソーダ	0.1
	(FAD 2mg ニコチン酸アミド 20mg/ml.)			
	$\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液(pH 7.4)	1.5		
	* 蒸溜水	0.5		
処理系	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ		同	上
	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ		同	上
	蒸溜水	0.2		
処理系	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ		同	上
	蒸溜水	0.4		

第15表 実験12の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室		副室	
未処理系	K-H 酸化酵素	0.5ml.	K-H 酸化酵素 (3回等電沈澱)	0.2ml.
	20mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.05% メチレン青	0.2
	* $\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液(pH 7.4)	2.0	1M コハク酸ソーダ	0.1
処理系	* のかわりに 安息香酸ソーダ (上記緩衝液)		同	上

	Green brei	K-H 酸化酵素
前処理としての水洗 初回抽出条件 初回等電点沈澱 条件	右に比較して簡単 0.05M 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 1M の醋酸緩衝液 (pH 4.6) で pH 5.4 に調整	徹底的に行う 0.04M 磷酸緩衝液 (pH 7.0) 0.2M の醋酸緩衝液 (pH 4.6) を一定量加える.*

(\* 結果的には pH 5.4 附近に調整される.)

反応時間は主・副室混合前30分, 混合後2時間30分とし, 対照はそれぞれの反応時間0分のものを用いた. その他測定方法はIIに述べた方法による. 安息香酸ソーダは終濃度 1.25M, 0.94M, 0.50M, 0.376M, 0.25M, 及び 0.125M になるように加えた. 以上の反応を2回行なった結果はいずれの反応においても亜硝酸の減少は認められなかつた. なお反応中サフラニンは完全にロイコ型を示していた.

#### 実験 11 標品 (2-3) を用いての実験

チトクローム酸化酵素のさらに高度の精製品標品 (2-3) を用いた. なお少量の K-H 酸化酵素 (3 回等電点沈澱) とコハク酸ソーダ・メチレン青を副室中におき, ここで作られるロイコメチレン青を水素供与体とした. 主室内に加えた FAD の意味については次章に述べる.

反応時間は主・副室混合前5分 (この時間でメチレン青はロイコ型になる), 混合後4時間10分, 対照は各々の反応時間0分のものを用いた.

これらの結果, いずれの反応においても亜硝酸の減少は認められなかつた.

#### 実験 12 K-H 酸化酵素を用いての実験

チトクローム酸化酵素の出発材料である K-H 酸化酵素の1回及び3回沈澱を用い, 反応液組成をつぎのようにして, 同様な実験を繰返した.

対照はそれぞれの反応時間0分のものを用い, 反応時間は主・副室混合前1時間, 混合後2時間30分. 安息香酸ソーダの終濃度は 0.57M, 0.29M, 0.143M, 0.057M について行なった.

以上の反応を duplicate に2回宛行なった結果はいずれも陰性結果に終つた. なお同じ条件で硝酸還元酵素活性出現の有無を調べたがやはり陰性であつたことを附記する.

#### 考察並びに小括

実験 10~12 に至るデータは, これらの条件ではチトクローム酸化酵素より亜硝酸還元酵素活性は生じないことを示している. 広範囲の安息香酸ソーダ濃度について実験が繰返されたが, いずれも陰性の結果に終

つた. このことは一応初期の推論の否定を意味する. 即ち亜硝酸還元酵素活性を生み出す蛋白はチトクローム酸化酵素ではないということになるし, またその精製の出発材料となる K-H 酸化酵素にもそれが含まれないことが明らかとなつた.

このことは K-H 酸化酵素の抽出方法が Green brei のそれと類似しているだけに重要である. 今この両者の抽出方法の相違点を, それぞれの1回等電点沈澱までについて表示すれば上表のごとくなる.

この表よりみると両者の相異点は, (1) ミオグロビン, ヘモグロビン 混入の有無, (2) 初回抽出の際の pH 及びイオン強度の差, (3) 等電点沈澱の際のイオン強度の差に要約される. このうち (1) については, 水洗を行わずに作つた K-H 酸化酵素でも本反応を示さなかつたことから, 影響ないものと考えてもよい. (2) (3) については次章において考察する.

#### IV. 本反応陽性蛋白抽出方法の検討及びフラビン体の本反応に対する関与

(附) DPN チトクローム C 還元酵素についての実験  
実験材料及び方法

FAD: 武田製薬のアデノフラビン (1ml. 中に FAD 2mg, ニコチン酸 20mg を含む) を使用

FMN: FMN·2H<sub>2</sub>O (武田製薬 LotNo. 239-1) を使用

RF; 最純品 (武田製薬) を使用

DPN チトクローム C 還元酵素: Mahler ら<sup>29)</sup>の方法に従つて牛心より作製した. 最初の等電点沈澱を冷蒸溜水で洗滌したものを標品 (1), これより10%エタノールで抽出したものを標品 (2) と便宜上名付けた.

pH の測定: 溶媒及び反応液に使用した緩衝液はガラス電極 pH 計で pH を測定した.

実験 13 Green brei の K-H 酸化酵素作製時の3回等電点沈澱について

初回の抽出及び等電点沈澱を Green brei 作製の方法で行ない, 2回目及び3回目の等電点沈澱を K-H 酸化酵素作製の方法で行なつたもの, 及びそれらの沈

澱上清について、それぞれ安息香酸ソーダ処理による亜硝酸還元酵素活性発現の有無を調べたところ、初回の Green brei には勿論活性は認められたが、上記 2 回及び 3 回沈澱及びそれらの上清には全く活性は認められなかった。

**実験 14** 上記上清の加熱濃縮液添加による活性回復

上記のように等電点沈澱を 3 回行なった Green brei に活性がないのは、これらの操作によつて何らかの低分子物質が失われたためであるかもしれない。このことの検討のために、3 回の等電点沈澱の際の上清を集めて濃縮し、これを活性の失われた Green brei に加えて活性の回復の有無を調べた。上清は弱酸性で 100 °C の湯煎上で濃縮、ろ過し、得られた螢光を帯びる黄色透明液を pH 7.0 に調整し、添加剤として使用した。

灰化し、これを pH 7.0 に調整した水溶液を上清濃縮液のかわりに用いて同様な反応を行なつたが、活性の回復は全く認められなかった。

**実験 16** フラビン体の関与

上記濃縮物の吸光値曲線及びその濃縮条件より、活性回復に有効な物質はフラビン体である予想がたてられたので、直接フラビン体を使用して、その作用の有無を調べた。反応液組成は実験 14 に準じ、上清濃縮物のかわりにフラビン体を代置した。その結果は第 18 表に示される。活性の単位は第 17 表と同じ。

安息香酸ソーダで処理しない系に亜硝酸還元酵素活性の認められないことは同時に確かめられた。

**実験 17** 本反応陽性蛋白抽出条件の検討

(1) M/20 磷酸緩衝液 (pH 8.0, イオン強度 0.145) 及び pH 6.8, イオン強度 0.10) で抽出し, 1M 醋酸緩衝液 (pH 4.6) で pH 5.4 で等電点沈澱した標品

第 16 表 実験 14 の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室		副室	
1 回沈澱系 1	Green brei (1 回沈澱) 1mg/dl NaNO <sub>2</sub> $\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4) * 蒸溜水	0.5ml. 0.5 1.7 0.5	Green brei (1 回沈澱) 0.5M コハク酸ソーダ 0.05% メチレン青	0.2ml. 0.1 0.2
2	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ	0.5	同 上	
3 回沈澱系 3	Green brei (3 回沈澱) 上記心濃縮液 1mg/dl NaNO <sub>2</sub> $\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4) * 蒸溜水	0.5 0.2 0.5 1.5 0.5	Green brei (3 回沈澱) 0.5M コハク酸ソーダ 0.05% メチレン青	0.2 0.1 0.2
4	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ	0.5	同 上	

反応時間は主・副室混合前 1 時間 15 分, 混合後 3 時間。対照はそれぞれの反応時間 0 分のものを用いた。

以上の結果は第 9 表に示される。

**実験 15** 上清の灰化物についての実験

Green brei 等電点沈澱上清をあつめ、るつぼ中で

第 17 表 亜硝酸還元酵素活性

標品番号 反応系	(消失 NO <sub>2</sub> -m $\mu$ M/時間/mg 乾燥量)		
	1	2	3
1	0.0	0.0	0.0
2	0.80	0.23	0.22
3	0.0	0.0	0.0
4	0.88	0.26	0.20

第 18 表 フラビンによる活性回復

反 応 系		亜硝酸還元 酵素活性
等電点沈澱 1 回の Green brei	1	0.20
	2	0.23
上記等電点沈澱 3 回の Green brei	1'	0.00
	2'	0.00
1'+FAD (1.38 $\times 10^{-4}$ M)		0.17
1'+FMN (1.1 $\times 10^{-4}$ M)		0.23
1'+FR (2.88 $\times 10^{-4}$ M)		0.18
2'+FAD (1.38 $\times 10^{-4}$ M)		0.20
2'+FMN (1.1 $\times 10^{-4}$ M)		0.20
2'+FR (2.88 $\times 10^{-4}$ M)		0.20

第19表 牛心(除脂肪, 除線維, 肉挽器で細挫し, 冷蒸溜水で3回水洗し, 日本手拭でしぼつたもの)



を, Green brei (M/20 磷酸緩衝液 pH 7.4, イオン強度 0.13 で抽出し, 等電点沈澱法は上記に同じ) と比較した。

この結果は pH 8.0 で抽出したものに活性があり, pH 6.8 で抽出したのものには活性が認められなかった。pH 7.4 で抽出したもの (Green brei) に活性があることは勿論である。

(2) M/25 磷酸緩衝液 (pH 7.0, イオン強度 0.88) で3回抽出したものを等電点沈澱したものと, その残りを M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.4, イオン強度 0.13) で抽出・等電点沈澱したものとを比較した。両者の等電点沈澱はともに 1M 醋酸緩衝液 (pH 4.6) で pH 5.4 に調整して行なつた。(2) の操作は第19表に示される。操作はすべて 4°C 以下で行なわれた。

上清 (1) 及び (2) をともに 1M 醋酸緩衝液 (pH 4.6) で pH 5.4 に調整し, その遠心沈澱を M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.4) でホモジナイズして, それぞれ酵素標品とした。

結果は, 上清 (1) よりの標品は 0.34 $\mu$ M/時間/mg 乾燥量, 上清 (2) よりの標品は 0.64 の NO<sub>2</sub> の減少で, 後者に前者の約 2 倍の活性があつた。

#### 実験 18 凍結及び凍結乾燥標品についての実験

心筋を凍結したもの, 及び Green brei を真空凍結乾燥したものには本反応の活性は認められなかった。

#### 実験 19 DPN チトクローム C 還元酵素についての実験

DPN チトクローム C 還元酵素はチトクローム酸化酵素との呼吸機能における関連性, 抽出方法ははじめ

の段階が Green brei の作り方に近似すること (0.02M の K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> による弱アルカリ性抽出), それがフラビン鉄蛋白である<sup>20)</sup> などのため, 一応本反応の素材蛋白となり得ると考えて検討してみた。

その標品 (1) についての結果は 3 回の実験において 0.16, 0.17, 0.17 (消失 NO<sub>2</sub> $\mu$ M/時間/mg 乾燥量) の活性を示したが, その 1 段階精製された標品 (2) を真空凍結乾燥したものと, 4°C で 15 時間蒸溜水に透析してアルコールを除去したものについては, ともに活性が認められなかった。この条件で透析しても, この酵素に結合しているフラビンは遊離しない<sup>21)</sup> のであるが, 念のため FAD を 1.38 $\times 10^{-4}$ M の濃度に添加した系でもやはり活性はみられなかった。なお安息香酸ソーダで処理しない系には亜硝酸還元酵素活性は全く認められなかった。

また標品 (2) にはコハク酸脱水素酵素活性が殆んどないので, この場合の水素供与体は, 副室中で少量の標品 (1) で作られたロイコメチレン青である。

#### 考察並びに小括

1. 実験 13~16 により, フラビン体が本反応に補酵素的な恢復作用をもつものであることを実証した。その作用機序については, 生成酵素への電子伝達体として働いているものか, 或いは素材蛋白の構成成分として必要なものか明らかではない。しかし本反応の活性を示さない Green brei の 3 回沈澱 (実験 13 の方法による) の反応系に対しても勿論水素供与体はロイコメチレン青として充分供給されており, 実験 6 により, こ

の水素供与体は本反応に対して機能を果していることが明らかであるから、この場合フラビン体が生成酵素への電子伝達体として必須であるとは考え難いであろう。

2. 実験 17 により本反応陽性蛋白の抽出には弱アルカリ側であることを必要とし、等電点沈澱の際のイオン強度は一応影響ないものと考えてよい。

3. 実験 18 はこの反応陽性蛋白が、その活性基が凍結乾燥により失活し易いおそらくリポ蛋白からなつてゐることを想像させる。

4. K-H 酸化酵素に Antimycin A で阻害される DPN チトクローム C 還元酵素活性が含まれることが最近報告されているが<sup>29)</sup>、実験 12 により K-H 酸化酵素は本反応陽性を示さないことを考慮すれば、実験 19 の陰性結果は当然と考えてよいだろう。

## V. 本反応陽性蛋白の分布

### 実験 20 細胞内分布

材料：屠殺直後のものを必要とするため、健常成熱家兎の心筋を使用した。家兎は頭部強打と同時に開胸して、胸部大動脈より脱血し、手早く心臓を採取し、氷冷した 0.25M の蔗糖液中で脂肪組織や線維組織を手早く取除き細切して心筋標品とした。操作はなるべく無菌的に行ない、蔗糖液は 60°~70°C 60 分間の間歇滅菌を行なつた。

細胞分劃法：等張蔗糖溶液 (0.25M) を用い、W. C. Schneider 法<sup>29)</sup>に従つて、家兎心筋細胞について

分劃した。

超遠心器：Phywe 製超遠心器を使用し、回転子は短半径 6 本掛のものを用い、その有効回転半径を 4.875cm とした。遠心は 4°C 以下で行なわれた。

酵素標品：得られた家兎心筋ミトコンドリア、ミクロソーム及び上清分劃を 0.25M 蔗糖液に浮遊させ、Potter-Elvehjem ガラスホモジナイザーで氷冷下 2 分間均質化したものを酵素標品とした。

対照はそれぞれの反応時間 0 分のものを用い、反応時間は主・副室混合前 40 分、混合後 3 時間、反応温度は 37°C である。

その結果は 18000×g 60 分間 2 回遠心の心筋細胞上清分劃標品の安息香酸ソーダ処理系のみ NO<sub>2</sub> 消失 0.19μM/時間/mg 乾燥量の活性が認められ、ほかの各系には活性は認められなかつた。

### 実験 21 臓器分布

臓器は健常な牛の肝、肺、腎、脾について検索した。酵素標品は牛心における Green brei 抽出の方法をそのままこれらの臓器に適用した。

対照は反応時間 0 分のものを用いた。各臓器抽出標品は、強弱の差はあつたが、いずれも副室内で充分ロイコメチレン青を生成した。

実験結果を第 22 表に示す。

### 実験 22 エーリッヒ腹水癌における活性

材料：エーリッヒ腹水癌接種マウスより、接種後 1 週間目の腹水を Green brei 抽出の方法に準拠し、そのまま氷冷 M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で 5 倍に

第 20 表 実験 20 の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室		副室	
未処理系	各分劃標品	0.5ml.	各分劃標品	0.2ml.
	1mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.1% メチレン青	0.2
	$\frac{M}{10}$ 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	1.0	0.5M コハク酸ソーダ	0.1
	* 蒸溜水	0.5		
処理系	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ 0.5		同上	

第 21 表 実験 21 の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室		副室	
未処理系	各臓器標品	0.5ml.	各臓器標品	0.2ml.
	1mg/dl NaNO <sub>2</sub>	0.5	0.1% メチレン青	0.2
	M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.4)	1.0	0.5M コハク酸ソーダ	0.1
	* 蒸溜水	0.5		
処理系	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ 0.5		同上	

第22表 牛臓器の Pro-Nitrite Reductase 分布

臓器	活性 (消失 NO <sub>2</sub> m <sup>μ</sup> M/時間/mg 乾燥量)
肝	(-)
腎	0.074
肺	0.43, 0.21
脾	(-)
心	0.36

薄め、氷冷下 ホモジナイズ (2 分間) し、遠心 4000 回/秒 (有効半径 10cm) 15 分の上清を、1M 醋酸緩衝液 (pH 4.6) で pH 5.4 に調整し、その遠心沈澱を M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で均質化したものを酵素標品とした。

第23表 実験22の反応液組成

反応液組成	ツンベルグ管主室	副室
未処理系	上記酵素標品 0.5ml.	上記酵素標品 0.2ml.
	1mg/dl NaNO <sub>2</sub> 0.5	0.1% メチレン青 0.2
	M/20 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 1.0	0.5M コハク酸ソーダ 0.1
	* 蒸溜水 0.5	
処理系	* のかわりに 1M 安息香酸ソーダ 0.5	同上

対照はそれぞれの反応時間 0 分のもを用い、反応時間は主・副室混合前 30 分、混合後 3 時間 30 分とした。

その結果 NO<sub>2</sub> 減量 0.18m<sup>μ</sup>M/時間/mg 乾燥量の値が得られた。但し副室内では使用した酵素標品はロイコメチレン青を充分には作り得なかつた。

#### 考察並びに小括

遠心分劃法により、本反応陽性蛋白の細胞内分布を調べると (実験20)、それが上清分劃にのみ存在していることがわかつた。所謂核分劃については測定しなかつたが、上清の活性の強さから、核分劃に本反応陽性蛋白の存在する可能性は薄いと思われる。なお、副室に加えた 18000×g 60分間 2 回の上清は、メチレン青を完全には脱色することはできなかつたが、もし水素供与体の濃度がさらに高ければ、活性はさらに高い値を示すことも考えられる。

呼吸酵素系はミトコンドリアに、解糖酵素系は細胞体の溶解分劃におもに存在するといわれている<sup>30) 31)</sup>。いまかりに生物進化の段階で、比較的小く発現した酵素系ほど、細胞内顆粒系との関係が密になる傾向があると仮定してみよう。とすればこの亜硝酸還元能を現わす蛋白は pro-nitrite reductase と名付けられる

べきもので、これは系統発生的にも、呼吸酵素系などより早く出現した。より原始的な蛋白体と考えることができるかもしれない。

この所謂 pro-nitrite reductase の正常臓器分布について検索され、肺には心と同程度の分布が認められたが、腎には痕跡、肝、脾には存在が認められなかつた。

#### IV. 考 察

ここに確認された pro-nitrite reductase の活性化に関する一新現象は、本質的には蛋白変性によるその機能の変化の問題である。同様な現象はヘム蛋白に関する研究<sup>32)</sup>、カタラーゼとペルオキシダーゼの相互転換<sup>32)</sup>、protyrosinase より tyrosinase への活性化

<sup>33) 34)</sup>、ribonuclease の活性促進に関する研究<sup>35-39)</sup> などにもみられている。これらの場合の変性は勿論軽度なものであつて、そのうち動因を除去すれば変性ももとへ恢復するものを Holden は“perturbation”と呼んでいる。変性的手段としては、大別して物理的なものと、化学的なものにわけられ、前者として 37°C の incubation<sup>39)</sup>、60~70°C の加熱<sup>34)</sup>、超音波曝射<sup>38)</sup>、反復せる凍結と融解<sup>39)</sup>、などが用いられ、その他にも種々の高エネルギー放射線なども考えられる。後者として硫酸処理<sup>35)</sup>、尿素、安息香酸ソーダ、サルチル酸ソーダ、ラウリル硫酸ソーダ<sup>32)</sup>、などの一連の蛋白変性剤やトリプシンのごとき蛋白分解酵素があげられる。これらの作用機序についても、純粋な蛋白構造の転換、蛋白表面基の unmasking、顆粒膜の破壊によるその内部蛋白の遊離、その他の不明なものがあるが、しかしこれは酵素反応の所謂促進剤ないし賦活剤と呼ばれるものとは作用機序の上で本質的に異なるものであることは勿論である。この研究で追求された現象が、顆粒系の破壊によるものでないことは II 及び V の実験によつてすでに述べたところである。さらにこれの本態を解明するためには、この pro-nitrite reductase の精製を試みなければならないであろう。ただここで明らかなのは、試験管内で安息香酸ソー

ダ処理によつて生ずる亜硝酸還元酵素には水素供与体としてロイコメチレン青が有効であり、またコハク酸脱水素酵素によつてコハク酸から電子伝達され得ること、この所謂 pro-nitrite reductase か、或いは生成した亜硝酸還元酵素のいずれかの活性基に-SH 基と重金属があるらしいことである。

ここにいう pro-nitrite reductase が進化の残遺物として残っているものか、或いは未分化の多潜勢の酵素蛋白プールの1つとして存在しているものかの解明も今後の問題である。教室山本の動物体の硝酸還元酵素の研究<sup>40)</sup>によれば、悪性腫瘍の成育過程ないし再生の過程において、胚初期発生で認められた鉄型の硝酸還元酵素が出現するが、これらのデータと実験2で認められたエーリッヒ腹水癌中の pro-nitrite reductase の存在及び実験2の事実とをあわせ考えることは興味深い。

## Ⅶ. 総 括

蛙胚初期発生及びエーリッヒ腹水癌の観察により、硝酸一、亜硝酸還元酵素活性の消長を確認し、その活性曲線とチトクローム酸化酵素の活性曲線は相反する消長をとることをみいだした。

以上の事実により、チトクローム酸化酵素の生合成素材を硝酸還元系酵素に求める推論を立て、試験管内でその逆を再現しようと試みたが、チトクロームオキシダーゼの高純度精製品よりは硝酸一、亜硝酸還元酵素活性は得られず、この推論は実証されなかつた。しかしその研究経過において Green brei 中には安息香酸ソーダ処理により亜硝酸減少能を生ずる蛋白分割があることをみいだした。

この現象が酵素反応によるものであることを解明し、本反応の若干の分析を行ない、かつフラビン体の本反応に対する関与をみいだした。

この新現象を来す蛋白分割の抽出条件について検討し、その DPN チトクローム C 還元酵素との同一性を否定した。

この現象を示す蛋白を細胞分割実験により心筋細胞の 18000×g の上清分割 (非顆粒分割) にみだし、これをかりに pro-nitrite reductase と名付け、このものの正常臓器分布及びエーリッヒ癌中の存在を示した。

御指導、御鞭撻を戴いた恩師石川教授、始終御教示を得た協同研究者倉田助教授、種々御協力を得た山本彰芳君、餅谷良平君及び他の教室同人に対し衷心より感謝の意を表します。

## 文 献

1) 倉田 : 蛋白質・核酸・酵素, 1, No. 1, 32

- (1956) 2) 谷口 : 生物科学, 9, 3号, 99 (1957) 3) 佐藤 : 酵素化学の進歩, Vol. 4, 85, 共立出版 (1954) 4) Sato, R. : Scienca Revuo., 2, 122 (1950) 5) Takahashi, H., Taniguchi, S., & Egami, F. : J. Biochem., 43, 223 (1956) 6) Ohara, M. & Suyama, T. : Nature, 169, 285 (1952) 7) 山田その他 : 生命現象の化学 (芦田, 江上, 吉川編) p. 676, 朝倉書店 (1955) 8) Holler, A. C. & Huch, R. V. : Anal. Chemistry, 21, No. 11, 1385 (1949) 9) 丹羽 : 酵素化学シンポジウム, 7, 68 (1952) 10) Neecham, J. : Chemical Embryology, Cambridge Univ. Press (1931) 11) Dannenberg, H. & Kiese, M. : Biochem. Z., 322, 395 (1952) 12) Eichel, B., Wainio, W. W. & Person, P. : J. biol. Chem., 183, 89 (1950) 13) Smith, L. & Stotz, E. : ibid., 209, 819 (1954) 14) Sato, R. : Inorganic Nitrogen Metabolism (W. D. McElroy & B. Glass 編), the Johns Hopkins Press, Baltimore, p. 163 (1956) 15) Taniguchi, S., Sato, R. & Egami, F. : ibid., p. 87 (1956) 16) Chung, C. W. & Najjar, V. A. : J. biol. Chem., 218, 617 (1956) 17) Green, D. E. & Brosteaux, B. : Biochem. J., 30, 1489 (1936) 18) 佐藤 : 酵素化学の進歩, Vol. 4, p. 91, 共立出版 (1954) 19) Inorganic Synthesis (W. C. Fernelius 編), Vol. 2, 81 (1946) 20) Sato, R. & Egami, F. : Bull. Chem. Soc. Japan, 22, 137 (1949) 21) Sato, R. & Niwa, M. : ibid., 25, 202 (1952) 22) Wainio, W. W., Cooperstein, S. J., Kollen, S. & Eichel, B. : J. biol. Chem., 173, 145 (1948) 23) Keilin, D. & Hartree, E. F. : Proc. Roy. Soc. London, Series B, 125, 171 (1938) 24) Hawthorne, J. R. & Harrison, D. C. : Biochem. J., 33, 1573 (1939) 25) Eichel, B. & Wainio, W. W. : J. biol. Chem., 175, 155 (1948) 26) Mahler, H. R., Sarkar, N. K., Vernon, L. P. & Alberty, R. A. : ibid., 199, 585 (1952) 27) Vernon, L. P., Mahler, H. R. & Sarkar, N. K. : ibid., 199, 599 (1952) 28) Colpa-Boonstra, J. P. & Slater, E. C. : Biochem. et Biophys. Acta, 23, 222 (1957)

- 29) **Schneider, W. C.** : J. biol. Chem., 176, 259 (1948)      30) **Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H.** : Cancer Research, 2, 1 (1951)      31) **Ernster, L. & Lindberg, O.** : Annal Rev. Physiol., 20, 13 (1958)
- 32) 上代 : 蛋白質・核酸・酵素, 1, No. 1, 1 (1956)      33) **Bodnie, J. H. & Allen, T. H.** : J. cellular Comp. Physiol., 18, 151 (1941)
- 34) **Bodine, J. H., Tahmisian, T. N. & Hill, D. L.** : Arch. Biochem., 4, 402 (1944)
- 35) **Roth, J. S.** : J. biol. Chem., 227, 591 (1957)      36) **Kunitz, M.** : J. Gen. Physiol., 24, 15 (1940)      37) **Pirotte, M. & Desereux, V.** : Bull. Soc. Chim. Belg., 61, 157 (1952)      38) **Schneider, W. C. & Hogeboom, G. H.** : J. biol. Chem., 198, 155 (1952)      39) **de Duve, C., et al** : Biochem. J., 60, 604 (1955)      40) 山本 : 十全会雑誌 本号.

#### Abstract

In the embryonic development of *bufo vulgaris*, the curve of cytochrome oxidase activity is antagonistic to that of nitrite reductase activity. It might be considered that these two enzymes took the reverse course of each other in the process of development of the living eggs. If it might be so, this could be proved also *in vitro*. The following experiment did not fulfil this expectation, but a certain fraction in Green brei, when chemically modified *in vitro* by a certain amount of sodium benzoate or urea, showed the nitrite reductase activity.

One milliliter and a half of Green brei suspension, 0.5ml. of 1/10mM NaNO<sub>2</sub> and 2ml. of benzoate solution in various concentrations (and 1ml. of 1/10 M phosphate buffer, pH 7.6) were placed in the Thumberg main tube, while 0.5ml. of Green brei suspension and 0.5ml. of 0.02% methylene blue were placed in the side arm. After evacuation the tube was incubated at 37°C. After an hour and a half, the contents were mixed and further incubated at 37°C for two hours and a half. After the contents were mixed, the leucomethylene blue which was produced in the side tube acted as hydrogen donor. The deproteinized solution by saturated uranium acetate was used for the quantitative determination of nitrite with Griess Ilosvay's reagent. A certain amount of benzoate which was to inactivate the cytochrome oxidase generated the nitrite reductase activity remarkably. This effect of benzoate was inhibited completely by adding SH-inhibitors such as p-chloromercuribenzoate or iodosobenzoate, with the partial by the addition of o-phenanthroline,  $\alpha$ - $\alpha'$ -dipyridyl, carbon monoxide or KCN.

In spite of great efforts this fraction could not be identified with Keilin-Hartree oxidase, cytochrome oxidase or DPN-cytochrome c reductase, and this was nominated as a pro-nitrite reductase.

Flavins were essential for the activation of this proenzyme.

The proenzyme was found in the supernatant fraction of rabbit heart muscle after centrifugation of the large granules and microsomes, and this was present in the cattle heart, lung and Ehrlich ascites tumor.