HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大豆根瘤のチトクロームオキシダーゼに關する研究
Author(s)	中村, 幸彦; 下村, 得治; 澤井, 功
Citation	北海道大學農學部邦文紀要, 2(1), 43-48
Issue Date	1954-09-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/11564
Type	bulletin (article)
File Information	2(1)_p43-48.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

大豆根瘤のチトクロームオキシダーゼに關する研究

中村幸彦・下村得治・澤井　功
(北海道大學農學部農藝化學教室)

A Study on the Cytochrome Oxidase prepared from Soy Bean Nodules.

By

Y. NAKAMURA, T. SHIMOMURA and K. SAWAI.
(Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agric., Hokkaido University)

まえがき

荳科植物の窒素固定能力は植物体の呼吸と密接な關係があると云う假定が WILSON[1] に依つて發表されているが，植物体の呼吸の中，特に窒素固定の場所である根瘤の呼吸に關しては辻村氏[2]の研究があるけれども，なお未解決の問題が多く殘されている。辻村氏は根瘤の呼吸機構について下圖の如き形式を推定した。

(a) $O_2 \rightarrow \underbrace{\text{hemoprotein} \rightarrow \text{lactoflavin}}_{\text{host-plant cell}} \rightarrow \underbrace{\text{dehydrase system} \rightarrow \text{substrate}}_{\text{bacteria}}$

(b) $O_2 \underbrace{\text{———————} \rightarrow \text{lactoflavin}}_{\text{host-plant cell}} \rightarrow \underbrace{\text{dehydrase system} \rightarrow \text{substrate}}_{\text{bacteria}}$

この様な推定は植物とバクテリヤとの共棲に於ける呼吸機構を明らかにする爲の一つの手掛りとして重要なものと思われるが，一般にラクトフラビンは蛋白質との結合体としてのみ呼吸に關與する觸媒となり得るものであつて，遊離ラクトフラビンの關與する呼吸形式は知られていない現狀である[3]。

周知の如く，根瘤中には根瘤ヘモグロビンが存在し，根瘤組織及びバクテリヤの好氣的呼吸を容易ならしめていると考えられているが，この様な好氣的呼吸に於ては，クーミナルオキシダーゼの一つとしてのチトクロームオキシダーゼ系を經る呼吸經路の存在も一應考えられる。然るに高等植物のチトクロームオキシダーゼ系に關する研究は玉蜀黍[4]，タバコ[5]，小麥[6]，大麥[7]，馬鈴薯[8]，燕麥[9]，ホウレン草[10]，オレンジ[11]，キヤベツ[12]，菜豆の發芽種子[13]，エンドウ苗[14]，chick-pea の胚[15]，等多數報告されているが，根瘤組織に關する研究は未だ行われていない。

以上の觀點から，大豆根瘤を用いチトクロームオキシダーゼ作用に就いて實驗した結果，その作用力を認めることが出來，從つて大豆根瘤の呼吸には，チトクロームオキシダーゼ系の關與する經路の存在が知られた。今回は本酵素の一般的性質について得られた結果を報告する。

I. 實驗材料及び實驗方法

使用大豆は北見長葉で，5月上旬播種，8月24日（ほぼ開花期終了）から9月15日（ほぼ結實期終了）の23日間にわたり，數回根瘤を採取，水洗後室溫で送風乾燥した。−10°C に貯藏。これについて適宜酵素液を調製した。

粗酵素液には，根瘤に約 1/3 量の蒸溜水を加え，かゆ狀になる迄磨碎，布を通して壓搾濾過，濾液を數分間遠心分離 (3000 r.p.m.)，傾斜によつて沈澱物を除去した溷濁液を使用した。

精製酵素液には，粗酵素液に結晶硫安を加へ 3/4 飽和とし，數分間遠心分離 (3000 r.p.m.)，傾斜

に依つて沈澱物を除去した溷濁液を流水に對して4～5時間透析した内液を使用。

酵素作用の測定には，パラフエニレンダイアミン (P.P.D.) を基質としてワールブルグ檢壓計によつて酸素消費量を測定。反應溫度 39°C。氣相は空氣。

II. 實驗結果

(1) 粗酵素液の場合。第1圖に示す如く加熱酵素液と基質の場合 (b) も，酵素液のみの場合 (c) も共に酸素の消費が見られるけれど，前者は基質の自働酸化によるものであり，後者は酵素液中に殘存すると思われる根瘤菌の呼吸による爲の酸素の消費と考えられる。從つて (b) 及び (c) の値を夫々 (a) の値から差引いた値がチトロームオキシダーゼ系に依つて消費された酸素量となる。粗酵素液 1 cc 中の乾物量は約 25 mg であるから，Q_{O_2} (乾物 1 g が 1 時間に消費した酸素量) を計算すれば次の如くなる。(a)−(b)−(c) は約 50 μl。$\frac{50}{12.5}\times 1000 = 4000$。即ち $Q_{O_2} = 4000\ \mu$l。この事より粗酵素液中にはチトクロームオキシダーゼ系の存在がうかがわれる。

(2) アルコール及びアセトンの影響。粗酵素液にアルコール及びアセトンを夫々加え 50% (容量) とする。生ずる沈澱と非沈澱液を遠心分離によつて分別し，兩者を1日間減壓乾燥後，始めの粗酵素液と同量の蒸溜水に懸濁せしめて酵素液とする。この場合は第1表に示す如く酸素消費量はむしろ對照より劣り，わずかにアセトン沈澱部のみがややまさつている。從つて根瘤オキシダーゼはアルコール及びアセトン處理並びに乾燥處理に

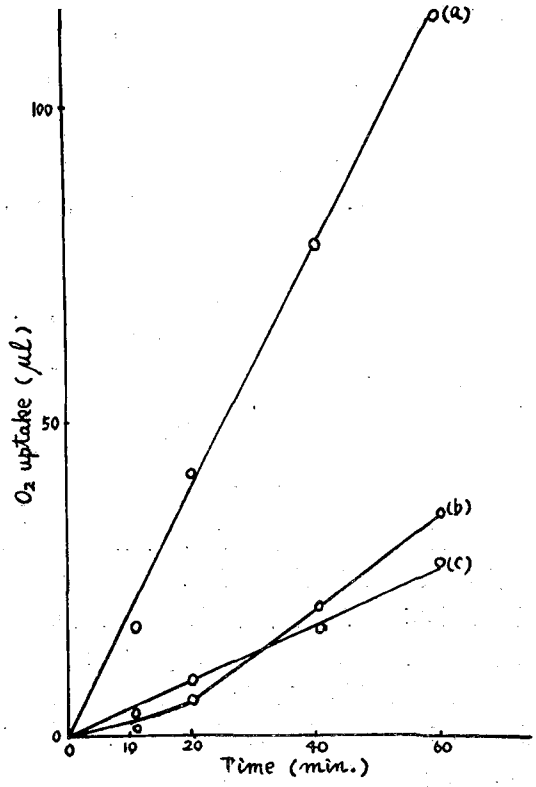

Fig. 1. O_2 uptake by crude enzyme preparation

(a) enzyme soln. 0.5 cc, $M/20$ phosphate buffer (pH 7.0) 0.5 cc, $M/25$ P. P. D. 0.5 cc.
(b) boiled enzyme soln. 0.5 cc, $M/20$ phosphate buffer (pH7.0) 0.5 cc, $M/25$ P. P. D. 0.5 cc.
(c) enzyme soln. 0.5 cc, $M/20$ phosphate buffer (pH 7.0) 1.0 cc.
10% NaOH in the center well in each case.

Table 1. The Effects of Alcohol and Acetone on the Crude Enzyme
(The eoncentrations of precipitants in medium are 50%)

main chamber			side arm	center well	O_2 uptake (μl)			
					10	20	40	60 (min)
Precipitate by alcohol	0.5 cc,	buffer 0.5 cc,	P. P. D. 0.5 cc,	NaOH 0.2 cc	1.1	5.5	5.9	8.6
Liquid part after removal of above preipcitate	0.5 cc,	" ,	" ,	"	0.2	1.9	2.7	4.1
Precipitate by acetone	0.5 cc,	" ,	" ,	"	5.0	6.7	11.1	16.5
Liquid part after removal of above precipitate	0.5 cc,	" ,	" ,	"	1.7	2.4	4.4	7.9
Control		" 1.0 cc,	" ,	"	2.3	3.4	6.3	9.6

よつて，相當程度不活性化され，之等の沈澱劑の使用では本酵素の精製は不可能であることが知られた。

(3) 硫安による精製。粗酵素液に再結晶した硫安を投入，$^3/_4$ 飽和とする。生ずる沈澱を遠心分離し，始めの粗酵素液と同量になる迄蒸溜水を加えたものを酵素液とした場合の結果は第2圖(a), (a′)の如くであつた。又 $^3/_4$ 飽和非沈澱部を傾斜によつて分離し，全飽和になる樣計算量の硫安を加えて生ずる沈澱を遠心分離，同樣に蒸溜水に懸濁せしめて酵素液とした場合の結果は第2圖(b), (b′)の如くであつた。更に又，$^3/_4$ 飽和沈澱部を除去した傾斜液を4～5時間流水に對して透析(セロフアン膜)した內液を酵素液とした場合は第2圖(c), (c′)の如くであつた。之等の結果を檢討すれば，對照として行つた(a′), (b′), (c′)の値を合計すれば約23 μl となり第1圖の(c)の値 26 μl とほぼ同一となる。又基質の自動酸化による酸素の消費量は(d)によつて示されているがこの値をも考え合せれば酸化酵素によらない酸素の消費量は全体として第1圖の(b)とほぼ一致した値となる。今各フラクションの酵素による酸素消費量を計算すれば，$^3/_4$ 飽和沈澱部の Qo_2 は約2180 μl，全飽和沈澱部のそれは約9480 μl，透析液のそれは約6800 μl となる。之等の値から本酵素は全飽和沈澱部の作用力が最大であり，透析によりやや作用力が失われることが知られた。透析酵素液のみの場合は反應1時間後の酸素消費は非常に少なく，わずかに1～2 μl であり以後の實驗には全てこの透析酵素液を用いた。

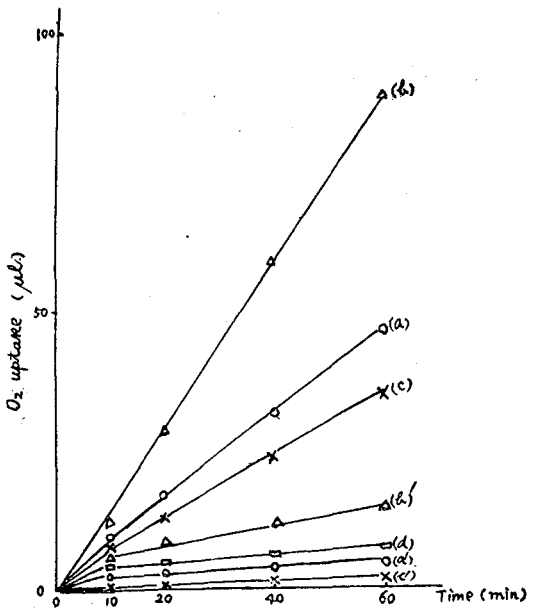

Fig. 2. O_2 uptake of each fraction by $(NH_4)_2SO_4$ and its dialysate.

(a) Precipitate of $^3/_4$ saturation 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P. P. D. 0.5 cc ; NaOH 0.2 cc.
(a′) Precipitate of $^3/_4$ saturation 0.5 cc, buffer 1.0 cc ; NaOH 0.2 cc.
(b) Precipitate of whole saturation (not contained (a)) 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P. P. D. 0.5 cc ; NaOH 0.2 cc.
(b′) Precipitate of whole saturation (not contained (a)) 0.5 cc, buffer 1.0 cc ; NaOH 0.2 cc.
(c) Dialysate of liquid part after removal of (a) 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P. P. D. 0.5 cc ; NaOH 0.2 cc.
(c′) Dialysate of liquid part after removal of (a) 0.5 cc, buffer 1.0 cc ; NaOH 0.2 cc.
(d) Control buffer 1.0 cc, P. P. D. 0.5 cc ; NaOH 0.2 cc.

(4) 熱に對する安定度。酵素液を夫々の溫度の溫浴中に10分間加熱後酵素作用を測定した。酵素液0.5 cc, $M/20$ 燐酸緩衝液 (PH 7.0) 0.5 cc を主室に，$M/25$ P.P.D 0.5 cc を側室に，10% NaOH 0.2 cc を副室に夫々入れ，39°C で測定を行つた。その結果は第2表の如くであつて，本酵素は60°C, 10分間の加熱により大部分破壞されることが知られた。

Table 2. Effect of Heat on Cytochrome Oxidase

Heating temp. °C	untreated	50	55	60	65
O_2 uptake (μl)/hr	25.1	24.5	21.6	6.4	1.7
Relative activity	100	98	86	25	7

(5) 最適 pH に就いて。前と同樣檢壓計主室には酵素液及び $M/20$ 燐酸緩衝液を0.5 cc づつ入れ，側室には $M/25$ P.P.D. を入れ，副室に10% NaOH 0.2 cc を入れ酵素作用を測定した。この場合は反應開始後20分後の酸素消費量を測定した。結果は第3表に示す如くであつて，本酵素の最適 pH は7.0附近にあることが知られた。

Table 3. Optimal pH of Oxidase Activity

pH	5.6	6.2	6.6	7.0	7.4	7.7	8.0
O_2 uptake for 20 min (μl)	4.5	3.3	11.8	14.5	11.9	9.5	11.6

(6) 阻害劑の影響。青酸加里の影響については第4表に示す如き結果が得られた。この場合の緩衝液は $M/3$ 燐酸緩衝液 pH 7.0, 0.5 cc を用い，種々の濃度の青酸加里溶液は 0.5 cc 宛基質と共に側室に入れて實驗した。此の結果から 3/1000M ではほぼ完全に阻害を受け 3/32,000M でも約 80% の阻害を受けることが知られた。次に一酸化炭素の影響については第3圖に示す如き結果となつた。この場合は副室に苛性ソーダは入れていない。又

Table 4. Effect of Potassium Cyanide on Oxidase Activity

concentration of KCN	$\frac{3}{1000}M$	$\frac{3}{2000}M$	$\frac{3}{4000}M$	$\frac{3}{8000}M$	$\frac{3}{16000}M$	$\frac{3}{32000}M$	0
Relative activity	2.2	11.2	14.6	15.0	18.0	21.3	100

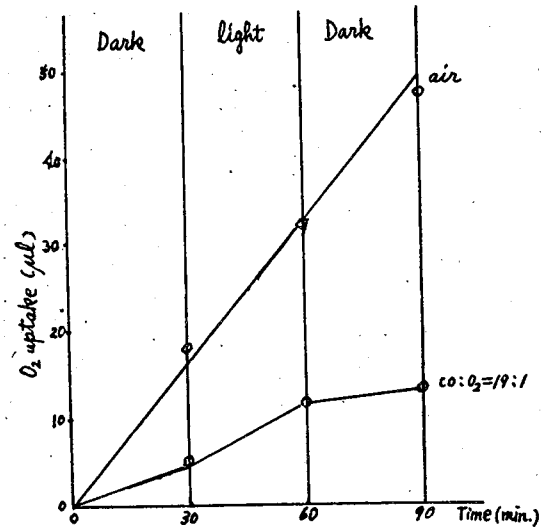

Fig. 3. The effect of CO in dark and light on the oxidase activity.

Enzyme soln. 0.5 cc, $M/3$-phosphate buffer pH 7.0, 0.5 cc, $M/25$ P.P.D. 0.5 cc; final volume 1.5 cc.

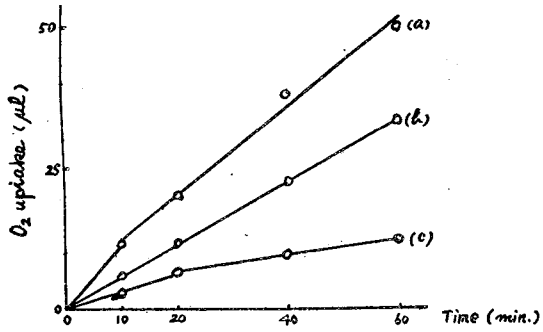

Fig. 4. O_2 uptake by crude enzyme preparation from greenish nodules.

(a) enzyme soln. 0.5 cc, $M/20$ phosphate buffer pH 7.0, 0.5 cc.
(b) enzyme soln. 0.5 cc, $M/20$ phosphate buffer pH 7.0, 1.0 cc.
(c) boiled enzyme soln. 0.5 cc, $M/20$ phosphate buffer pH 7.0, 0.5 cc, $M/25$ P.P.D. 0.5 cc.
10% NaOH (0.2 cc) in the center well in each case.

氣相は空氣の代りに一酸化炭素と酸素の比が約 95：5 の混合氣体をおきかえて實驗を行つている。この結果より一酸化炭素による阻害は明所より暗所に於て大であり，又對照である空氣を氣相とした場合に比較し著しく阻害を受けていることが知られる。

(7) 綠色根瘤のチトクロームオキシダーゼに就いて。9 月 15 日に採集した根瘤中から綠色の根瘤を選び，このもののチトクロームオキシダーゼ作用力を測定した。實驗操作及び測定法は前記の健全な赤色根瘤の場合と同樣にして行つた。結果は第4圖に示す如くであつて，對照區 (b) 及び (c) の酸素消費量を (a) の値から引いたもの，即ちチトクロームオキシダーゼ系によつて消費された酸素量を計算すれば，わずかに 2.5 μl に限ぎない。從つて綠色根瘤から調製した粗酵素中の該オキシダーゼ作用は殆んどないか又はあつても微弱なものであることが知られた。更に綠色根瘤の粗酵素

液について，赤色根瘤に對して處理したと同様に硫安による分別沈澱を施行し，各フラクションから得られたものを酵素液として，酸素消費量を測定した結果は第5圖に示す如くである。この場合

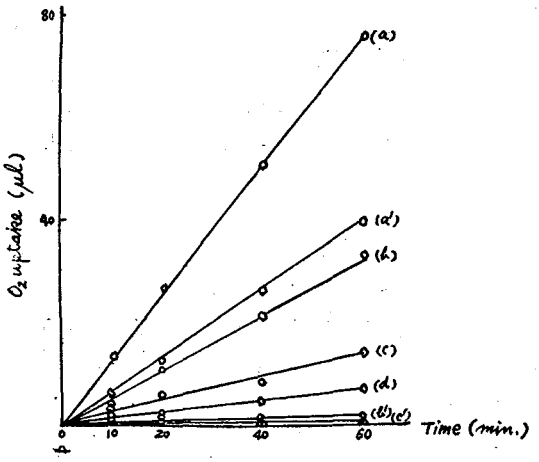

Fig. 5. O_2 uptake of each fraction of greenish nodules by ammonium sulfate and its dialysate.

(a) precipitate of 3/4 saturation 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P.P.D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.
(a') precipitate of 3/4 saturation 0.5 cc, buffer 1.0 cc; NaOH 0.2 cc.
(b) precipitate of whole saturation (not contained (a)) 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P.P.D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.
(b') precipitate of whole saturation (not contained (a)) 0.5 cc, buffer 1.0 cc; NaOH 0.2 cc.
(c) Dialysate of liquid part after removal of (a) 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P.P.D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.
(c') Dialysate of liquid part after removal of (a) 0.5 cc, buffer 1.0 cc; NaOH 0.2 cc.
(d) control; buffer 1.0 cc, P.P.D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.

の 3/4 飽和沈澱部から得られた酵素液では Qo_2 は約 2000 μl であつて，これは赤色根瘤の同一沈澱部の Qo_2 約 2180 μl とほぼ同程度の値を示す。全飽和の場合では赤色根瘤の Qo_2 は前記の如く約 9480 μl であるのに對して，綠色根瘤のそれは約 1960 μl であつて，遙かに低い値である。又透析酵素液について比較すれば，赤色根瘤の場合の Qo_2 が約 6800 μl であるのに對して，綠色根瘤では約 1200 μl と低い値を示すのである。即ち，粗酵素液では殆んど認められなかつた作用力も，硫安處理によつて，各フラクションに，その作用が認められるのである。之等の結果から赤色及び綠色根瘤に於ける該酵素の作用力は赤色根瘤の方が遙かに強力であつて，しかもその消長の內容は 3/4 飽和非沈澱部に於ていちぢるしい相異のあることが知られるのである。たまたま，3/4 飽和非沈澱部は赤色根瘤では根瘤ヘモグロビンのフラクションに相當するのであつて，根瘤ヘモグロビンの消失した綠色根瘤の酵素作用力が赤色根瘤のそれよりも弱いと云う事實は，最近筋肉に於て，ミオグロビンの含量とチトクロームオキシダーゼ作用力とが並行關係にあることが明らかにされた[16]樣に，根瘤に於ても，根瘤ヘモグロビン含量とチトクロームオキシダーゼ作用力が並行關係にあることが推定される。

III. 要　約

1. 大豆根瘤(赤色及び綠色)にはチトクローム酸化酵素が存在することをワールブルグ檢壓法によつて知つた。

2. 本酵素はアルコール及びアセトン處理によつて大部分活性を失うが，硫安による分別沈澱及び透析によつて或る程度精製された。

3. 赤色根瘤の硫安 3/4 飽和非沈澱部から透析によつて調製した酵素液について，2・3 の性質を調べた結果は次の如くであつた。60°C 10 分間の加熱により大部分破壞されること。最適 pH は 7.0 附近にあること。3/1000 M の青酸加里で完全に阻害されること。一酸化炭素による阻害は明所に於けるよりも暗所の方が大であることを確めた。

4. 赤色根瘤の酵素作用の方が綠色根瘤のそれよりも大である。即ち赤色及び綠色根瘤の 3/4 硫安飽和沈澱部から調製した酵素液の Qo_2 は夫々約 2180 μl 及び約 2000 μl でほぼ同じ値を示すが，全飽和沈澱部 (3/4 飽和沈澱部を含まず) からの酵素液の Qo_2 は夫々約 9480 μl 及び 1960 μl であつて，綠色根瘤の方が遙かに小さい値を示した。

5. 之等の結果より，大豆根瘤の呼吸にはチクローム酸化酵素系の關與する呼吸經路の存在が確められた。又根瘤ヘモグロビン含量とチトクロームオキシダーゼ作用力とが並行關係にあるとの

推定が得られた。

文　献

1) Wilson P. W.: Univ. Wisc. Res. Bul., 1, 129, 1935.
2) 辻　村；農化, 24, 266, 1951.
3) R. Kuhn, H. Rudy: B., 69, 2557, 1936.
4) R. E. Maxwell: Plant Physiol., 25, 251, 1950.
5) H. G. du Buy, M. W. Woods, and Mary D. Lackey: Science, III, 572, 1950.
6) Allan H. Brown and David R. Goddard: Am. J. Botany, 28, 319, 1941.
7) C. A., 45, 8088^{e}, 1951.
8) Levy. H. & Schade. A. L.: Arch. Biochem., 19, 273, 1948.
9) BONNER. J.: Am. J. Botany, 36, 429, 1949.
10) ROSENBERG. A. G., and DUCET. G.: Compt. rend., 229, 391, 1949.
11) HUSSEIN A. A.: J. Biol, Chem.: 155, 201, (1944).
12) C. A., 45. 7199^{a}, 1951.
13) R. HILL, K. BHAGVAT: Nature, 143, 726, 1939.
14) C. A., 44, 10762^{b}, 1950.
15) ALBAUM, NAVIKOFF & OGUR: J. Biol. Chem, 165, 125, 1946.
16) R. A. LAWRIE: Biochem. J., 55, 299, 305, 1953.

Summary

Nodules were picked off from the roots of soy bean plants during the ripening period (from 25 August to 15 September), washed several times with water, ground in a glass-mortar and filtered through cloth. After centrifugation, reddish white turbid suspension was obtained. It was found that this suspension showed the cytochrome oxidase activity, when p-phenylendiamine was used as substrate. Ammonium sulfate was added to this crude enzyme suspension (saturation degree was $^{3}/_{4}$). After centrifugation, the liquid phase was dialysed to the running water for 4～5 hrs. On the dialysate obtained after above method, the cytochrome oxidase activity and its properties were examined manometrically at 39°C.

1. The Qo_2 of this enzyme preparation was about 6800 μl/hr./g dry weight.
2. This oxidase activity was greatly inactivated by both alcohol and acetone.
3. The optimal pH of this enzyme was about 7.0 and a greater part of its activity was lost by heating at 60°C for 10 min.
4. Moreover, the effects of potassium cyanide and of carbon monoxide ($CO: O_2 = 19:1$) on the enzyme activity were examined. (Refer to Fig. 3 and Table 4)

Using the preparation from the intact reddish nodules, the enzyme activity was as follows: The Qo_2 of the precipitate produced by $^{3}/_{4}$ saturation with ammonium sulfate was about 2180 and the Qo_2 of the saturated fraction about 9480.

Using the preparation from the greenish nodules, the enzyme activity was as follows: The Qo_2 of the precipitate obtained by $^{3}/_{4}$ saturation with ammonium sulfate was about 2000 and the Qo_2 of the saturated fraction about 1960.

From these experimental results, it was suggested that the cytochrome oxidase activity would be parallel to the content of leghemoglobine in nodules and that the cytochrome oxidase system would participate in the respiration process of nodules.