



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



大豆根瘤のチトクロームオキシダーゼに関する研究

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)

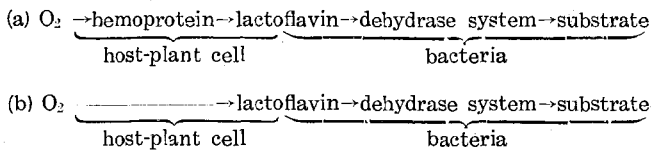
A Study on the Cytochrome Oxidase prepared from Soy Bean Nodules.

By

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

まえがき

豆科植物の窒素固定能力は植物体の呼吸と密接な関係があると云う假定が WILSON¹⁾ 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関しては辻村氏²⁾の研究があるけれども、なお未解決の問題が多く残されている。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。



この様な推定は植物とバクテリア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と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状である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ア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、タ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経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⁾、小麦⁶⁾、大麦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、従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経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、水洗後室温で送風乾燥した。-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 1/5 量の蒸留水を加え、かゆ状になる迄磨碎、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濁液を使用した。

精製酵素液には、粗酵素液に結晶硫酸を加へ 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濁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、パラフェニレンジアミン (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、後者は酵素液中に残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。従つて (b) 及び (c) の値を夫々 (a) の値から差引いた値がチトク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 $50 \mu\text{l} \cdot \frac{50}{12.5} \times 1000 = 4000$ 。即ち $Q_{O_2} = 4000 \mu\text{l}$ 。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留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。従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

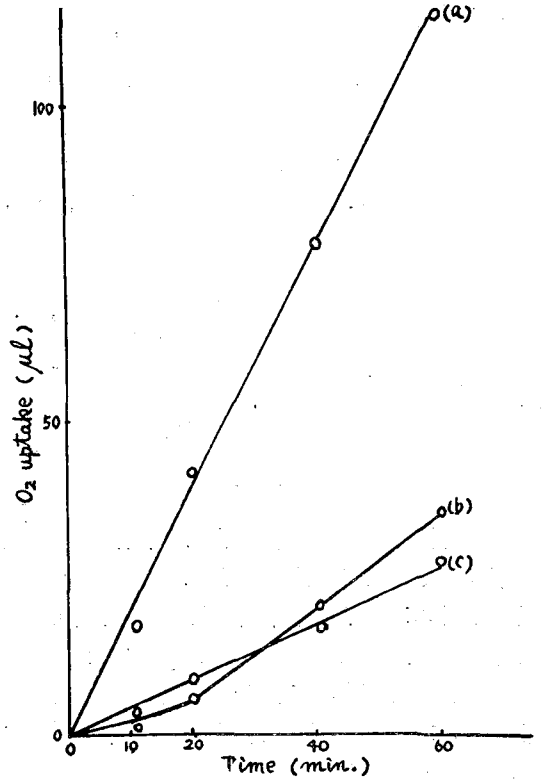


Fig. 1. O₂ uptake by crude enzyme preparation

- (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 (pH 7.0) 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 concentrations 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 precipitate	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) 硫酸による精製。粗酵素液に再結晶した硫酸を投入、 $\frac{3}{4}$ 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 $\frac{3}{4}$ 飽和非沈澱部を傾斜によつて分離し、全飽和になる様計算量の硫酸を加えて生ずる沈澱を遠心分離、同様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')

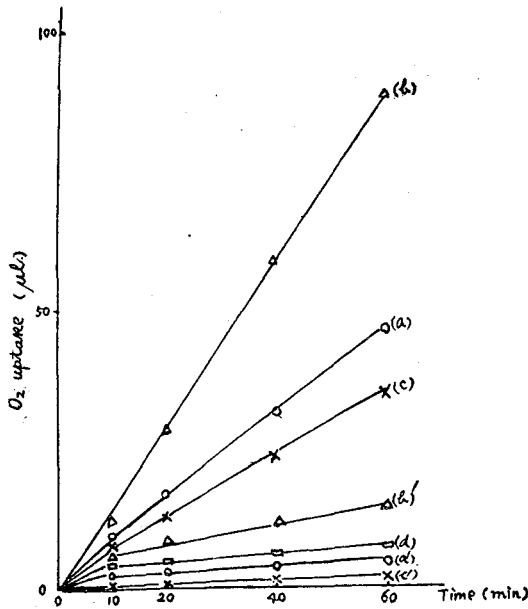


Fig. 2. O₂ uptake of each fraction by (NH₄)₂SO₄ and its dialysate.

- (a) Precipitate of $\frac{3}{4}$ saturation 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P. P. D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.
- (a') Precipitate of $\frac{3}{4}$ saturation 0.5 cc, buffer 1.0 cc; NaOH 0.2 cc.
- (b) Precipitate of whole saturation 0.5 cc, (not contained (a)) buffer 0.5 cc, P. P. D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.
- (b') Precipitate of whole saturation 0.5 cc, (not contained (a)) 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.

の如くであつた。更に又、 $\frac{3}{4}$ 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(セロファン膜)した内液を酵素液とした場合は第2圖(c), (c')の如くであつた。之等の結果を検討すれば、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、 $\frac{3}{4}$ 飽和沈澱部のQO₂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。

(4) 熱に對する安定度。酵素液を夫々の温度の温浴中に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壊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。前と同様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) 阻害剤の影響。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

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

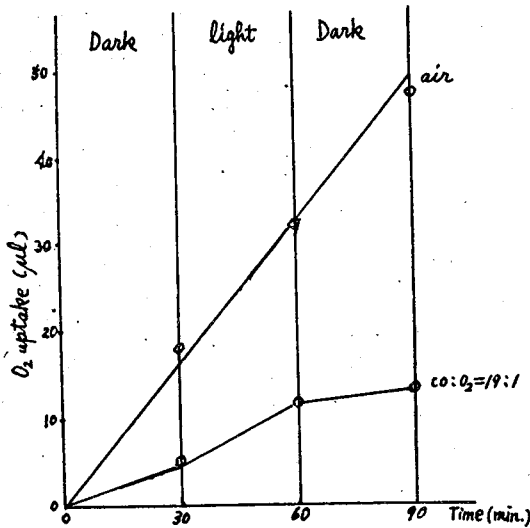


Fig. 3. The effect of CO in dark and light on the oxidase activity.

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.

氣相は空氣の代りに一酸化炭素と酸素の比が約 95:5 の混合氣體をおきかえて實驗を行つてゐる。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

緩衝液は *M*/3 磷酸緩衝液 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 3/1000*M* ではほぼ完全に阻害を受け 3/32,000*M* 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

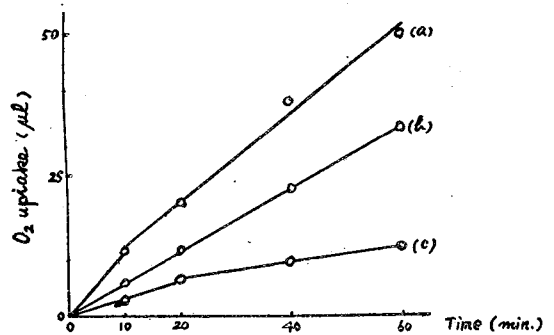


Fig. 4. O₂ uptake by crude enzyme preparation from greenish nodules.

- (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.

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様にして行つた。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、わすかに 2.5 μl に限ぎない。従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、赤色根瘤に対して処理したと同様に硫酸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

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、しかもその消長の内容は $\frac{3}{4}$ 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、 $\frac{3}{4}$ 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¹⁰⁾様に、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、硫酸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. 赤色根瘤の硫酸 $\frac{3}{4}$ 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壊されること。最適pHは7.0附近にあること。3/1000M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 $\frac{3}{4}$ 硫酸飽和沈澱部から調製した酵素液の Q_{O_2} は夫々約2180 μ l及び約2000 μ lでほぼ同じ値を示すが、全飽和沈澱部($\frac{3}{4}$ 飽和沈澱部を含まず)からの酵素液の Q_{O_2} は夫々約9480 μ l及び1960 μ l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トクローム酸化酵素系の關與する呼吸経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

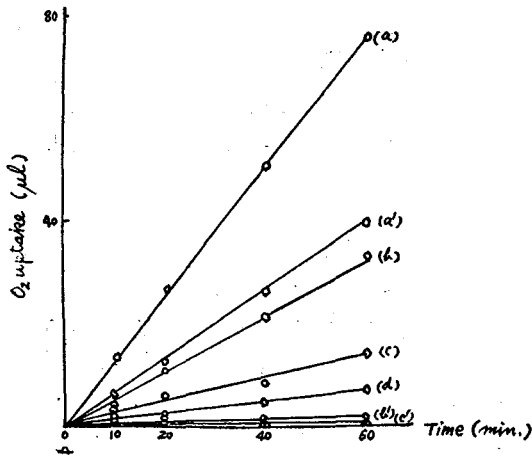


Fig. 5. O_2 uptake of each fraction of greenish nodules by ammonium sulfate and its dialysate.

- (a) precipitate of $\frac{3}{4}$ saturation 0.5 cc, buffer 0.5 cc, P.P.D. 0.5 cc; NaOH 0.2 cc.
- (a') precipitate of $\frac{3}{4}$ 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 $\frac{3}{4}$ 飽和沈澱部から得られた酵素液では Q_{O_2} は約2000 μ lであつて、これは赤色根瘤の同一沈澱部の Q_{O_2} 約2180 μ lとほぼ同程度の値を示す。全飽和の場合では赤色根瘤の Q_{O_2} は前記の如く約9480 μ lであるのに対して、綠色根瘤のそれば約1960 μ l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 Q_{O_2} が約6800 μ lであるのに対して、綠色根瘤では約1200 μ l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

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^a, 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^a, 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 $\frac{3}{4}$). 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 Q_{O_2} of this enzyme preparation was about 6800 μ l/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 Q_{O_2} of the precipitate produced by $\frac{3}{4}$ saturation with ammonium sulfate was about 2180 and the Q_{O_2} of the saturated fraction about 9480.

Using the preparation from the greenish nodules, the enzyme activity was as follows: The Q_{O_2} of the precipitate obtained by $\frac{3}{4}$ saturation with ammonium sulfate was about 2000 and the Q_{O_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.