



Title	海藻の窒素同化機構に関する研究－Ⅰ：硝酸還元酵素作用力測定法に就て
Author(s)	高木, 光造; TAKAGI, Mitsuzo; 村田, 喜一 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 4(4), 296-305
Issue Date	1954-02
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/22828">https://hdl.handle.net/2115/22828</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	4(4)_P296-305.pdf



# 海藻の窒素同化機構に関する研究—I

硝酸還元酵素作用力測定法に就て

高木光造・村田喜一

(水産食品化学教室)

## STUDIES ON THE MECHANISM OF NITROGEN ASSIMILATION IN MARINE ALGAE—I

On the Measurement of Nitrate Reductase Activity

Mitsuzo TAKAGI and Kiichi MURATA

(Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

Higher plants take nitrate from soil as nitrogen source, and have the ability to build up complicated organic compounds containing nitrogen, such as protein, nucleic acid, phosphate, and various vitamins, in the bodies.

As to the first chemical changes of nitrate taken up from roots, there are two cases; in the one case the change is enzymic reduction in roots, and in the other in the leaves. Besides these, there are some cases, which are seen under the abnormal conditions, the nitrate reduction is not performed in the roots but translocated to the tops, otherwise it takes place in the leaves as well as in the roots. Marine algae also mainly utilize nitrate in sea water as nitrogen source. But the mechanism of taking up nutritious salts is different from that of higher plants. In marine algae the rôle of the holdfasts is only to adhere to rocks and hold their bodies, consequently the various nutritious salts are taken up by osmotic pressure from surface of frond. Therefore, the enzymic reduction of absorbed nitrate may be taken place in frond.

Concerning to the first materials produced by the action, many different opinions have been stated, while, nowadays, it is said that the materials are supposed to be nitrite. Eckerson, 1924, reported the enzyme, "*nitrate reductase*" which takes part in the production of nitrite. According to him, when the water extract of freshly mashed plant tissue is incubated with nitrate and glucose at pH 7.2~7.4, aerobically, for several hours, nitrite is produced, and the activity is largely confined to tissue which do in fact possess *in vivo* the power of nitrate reduction. A variety of workers have further investigated this enzyme, but without concordant results, so it is conjectured, that in fact the production of nitrite in the Eckerson experimental technique may be largely or wholly due to microorganisms. But some enzymes from higher plants do assuredly nitrate reduction. There are the aldehyde dehydrogenase of potato tubers, and the lactic dehydrogenase of soybean seedlings, both dehydrogenases can utilize nitrate as an hydrogen acceptor in the production of nitrite. But

few investigations were reported regarding to the existence of these enzymes in other plants.

It is known in some bacilli (for example, *E. coli*) there is an enzyme, nitrate reductase, which acts as the catalist of the transferring of hydrogen from the last hydrogen transmitter to nitric acid, taking position at the end of hydrogen transmitter system, which hydrogen obtained from hydrogen donators such as, formic acid, succinic acid, and alanine, is given to hydrogen acceptor, nitric acid, through some hydrogen transmitters. Nitric acid accepts hydrogen by this enzyme and is reduced to nitrite.

Although we can expect in higher plants and marine algae the existence of the enzyme which takes the above mentioned rôle in nitrate assimilation, it has been scarcely cleared. It would be of great interest to determine further properties of this important enzyme of the nitrogen metabolism of plants involving marine algae.

One of us, Takagi, has carried on the study of the catalase for clarifying the physiological significance of chromoproteid in marine algae. The investigation of the problems of nitrogen assimilation must be done to bring to light the mechanism of photosynthesis. We took hand in the study of nitrate reductase.

The concentration of nitrate ion, which marine algae can utilize as nitrogen sources, is respectively 0.0022~0.0033 mg% in the Liman Current of Japan Sea, and 0.0006~0.029 mg% in the Tsushima Current, and the concentration is variable not only by water depth but by seasons. For example, in the sea of Shuna Island in England, it is 0~0.0062 mg% from July to August, and 0.0403~0.0415 mg% from January to February. Marine algae such as *Laminaria* grow in the season, when the nitrate decreases in sea water. On the contrary, marine algae such as *Porphyra* grow in the season, when nitrate is abundant in sea water. Therefore, we can easily expect that there may be great difference in activities of the nitrate reductase in those marine algae. If the optimum concentration of nitrate ion and the best conditions of nitrate assimilation would be clarified, the security and increasing of various useful algal stocks would be possible. Further, we think, if environmental conditions could be limited and by which quantity of protein could be increased, the expectation to the increase of nutritive value would be possible. We want to study the above mentioned problems, and in this paper we investigated the experimental conditions of the activity of the nitrate reductase in *Porphyra yezoensis* and examined the measuring method.

1. The most suitable concentration of substrate, nitrate ion is 6.82 mg%.
2. The most suitable concentration of hydrogen donator, lactate is 462.8 mg%.
3. Optimum pH of the nitrate reductase is 7.17.
4. Incubation temperatures and durations were examined.

From the above results the following method is introduced. Five cc of M/15 Sørensen's phosphate buffer solution (pH 7.17), 1cc of 0.011M potassium nitrate, 1cc of 0.52M sodium lactate, 2cc of enzyme solution and 1cc of water are mixed in Thunberg tube. The tube is kept in vacuo (<10mm Hg) and incubated at 20°C for one hour. After incubating and removing protein, the activity of the enzyme is estimated by determining the appearance of nitrite colorimetrically with Griess-Ilosvay reagent.

緑色植物は窒素源として土壤中から硝酸塩を摂取し、それを基として蛋白質、核酸、磷脂質をはじめ、いろいろのビタミンに至るまでの複雑な含窒素有機物を体内で巧みに合成する能力をもつが、根より吸収された硝酸塩が植物体内で先づ受ける化学変化については、そのまゝ根において酵素的還元を受けるもの<sup>(1)</sup>と葉に運ばれてから受けるものとの二つがある。又条件を変えることによつて本来根において還元さるべきものがその位置を変えて葉に移行するもの<sup>(2)</sup>もあり、根と葉いずれにおいても同程度に還元を行うもの<sup>(3)</sup>もある。海藻も亦窒素源として海水中の硝酸塩を最もよく利用するが、栄養塩摂取の機構は陸上の緑色植物とはその趣を異にし、根は岩礁に附着して体を支えるに過ぎず栄養塩は専ら葉面より滲透圧によつて摂取している。従つて吸収された硝酸塩は葉において酵素的還元を受けるものと思われる。

而して酵素的還元を受けて最初に生成される物質については種々議論のあるところであるが、今日では亜硝酸であろうということに大体の意見が一致している。今硝酸塩が還元されて亜硝酸の生成が行われる場合、これに与る酵素については各々その説を異にするが、古く Eckerson<sup>(4)</sup>はこの還元を行う酵素即ち硝酸還元酵素を植物体に証明している。即ち組織の磨碎液に葡萄糖と硝酸塩とを加え、pH 7.2~7.4 に数時間好氣的に反応させると亜硝酸が生成され、しかも硝酸同化力の強い組織程この酵素作用も強いというのである。しかしその後多くの研究者<sup>(5)(6)(7)</sup>が氏の実験を追試したが一致した結果がえられなかつたので、Eckersonの実験における亜硝酸の生成は恐らく大部分が細菌によつたものであろうと推論された。しかし植物体からえられる酵素で、確実に硝酸の還元を行うものがある。それはジャガイモの塊茎のアルデヒド脱水素酵素<sup>(8)</sup>と大豆のモヤシの乳酸脱水素酵素<sup>(9)</sup>であり、これらはいずれも水素受容体として硝酸塩を利用し、亜硝酸を生成することが知られている。しかしこれらの酵素がどの程度他の植物にも含まれているかは今尙不明である。

又ある種細菌 (*E. coli*)<sup>(10)</sup>には硝酸を亜硝酸に還元する酵素の存在することが知られており、この酵素<sup>(11)</sup>は蟻酸、コハク酸、アラニンのような水素供与体からとれてきた水素がいくつかの水素伝達体を経て最後に水素受容体である硝酸に渡される一連の水素伝達系の末端に位置して、最後の水素伝達体から硝酸への水素の授受を触媒する酵素であることが明らかとなつた。即ち硝酸はこれによつて水素を受取り亜硝酸に還元されるのである。

緑色植物や海藻においてもこれと同様の酵素が硝酸同化に与つていることは十分期待できることであるが、未だこれを支持する根拠はひとつもえられていない。これら植物の窒素代謝において、この重要な役割を演ずるこの酵素の本性を究明することは極めて興味ある問題である。

偶々著者の一人(高木)<sup>(12)</sup>はさきに海藻の色素蛋白の生理的意義を究明する目的でカタラーゼの研究に着手したが、光合成の機構を解明するには更に窒素同化の問題の検討を必要とするので、引続き硝酸還元酵素の研究を始めた。

海藻が窒素源として利用している硝酸イオンの濃度はその例を日本海リマン海流<sup>(13)</sup>にとると 0.0022~0.033mg%, 対馬海流<sup>(13)</sup>にとると 0.0006~0.029mg% で深度により異なるばかりでなく、時期的にも著しく異り一例を英国の Shuna Island<sup>(14)</sup>にとると 7, 8月には 0~0.0062mg% の最小値をとり、1, 2月には 0.0403~0.0415mg% の最高値をとるが、硝酸イオンの少い時期に最盛期を迎えるコブのような海藻は窒素含量が少く、それと反対に硝酸イオンの多い時期に最盛期を迎えるアマリのような海藻は窒素含量が多い。従つてこれら海藻相互間における硝酸還元酵素作用力にも亦著しい差のあることが容易に予想されるところである。更に著者は藻類によつて利用される硝酸イオンの最適濃度と硝酸同化の最適条件を知ることが出来れば、それによつて各種有用藻類の資源確保と増産に資することも可能であるばかりでなく、環境条件を制扼することによつて蛋白含量を著しく増進せ

しめうるとすれば食品的価値の増大を期することもあながち無理ではないと考え、以上の諸問題について研究を行わんとしたものであるが、本報においては先づ硝酸還元酵素作用力測定法の検討を試みスサビノリを供試して試験を行つたのでその結果について報告する。

本研究は文部省科学研究費による援助によつて遂行しえた。記して文部省に対して謝意を表する。又実験遂行に当り終始労を惜まず協力された佐々木宏司、池田昌一郎、細田毅一の三君に対し心から謝意を表する。

## 実験方法

### A. NO<sub>2</sub><sup>-</sup>透過率標準直線の作製

硝酸還元酵素作用力を測定する予備実験として先づ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>透過率標準直線の作製をする必要がある。即ち水素供与体の存在の下に硝酸塩に硝酸還元酵素を働かせて生ずる亜硝酸を Griess-Ilosvay 試薬によつて定量する方法に準拠したので、予め既知量の亜硝酸溶液に Griess-Ilosvay 試薬を加えて生ずる呈色の度合を光電比色計によつて測定し、NO<sub>2</sub><sup>-</sup>透過率標準直線を作製した。

#### (1) 試薬の調製:

##### (a) NaNO<sub>2</sub>標準溶液

1.009gのAgNO<sub>2</sub>を水に溶解し、これにやゝ過剰の純NaCl溶液を加え、生ずるAgClを濾別し、よく洗滌して濾液及び洗液を合し更に蒸留水を加えて全量を1Lとする。次にこれより10ccをとり水を加えて100ccとなし、更にその15ccをとつて水を加えて全量を100ccとし、これを標準液とする。かくするときは標準液1ccは4.5μgのNO<sub>2</sub><sup>-</sup>に相当する。

##### (b) Griess-Ilosvay 試薬

0.5gのSulfanilic acid (H<sub>2</sub>N·C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>·SO<sub>3</sub>H+2H<sub>2</sub>O)を30% Acetic acid (比重1.041) 150ccに溶解す。次に0.1g純α-Naphthylamine (C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>·NH<sub>2</sub>, mp 50°C)を20ccの温水に溶解し、これを濾過して前液に加える。本液は小瓶に充たしてパラフィンで封じ、空気にふれるのをさけて保存する。

#### (2) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>透過率標準直線の作製

次にNaNO<sub>2</sub>標準溶液を一定量宛とり、これに硝酸還元酵素の除蛋白脱色液2.5ccを加え、更に蒸留水を加えて10ccとした後Griess-Ilosvay試薬2ccを加え40°Cに15分間加温すると呈色は最大に達する。これを直ちに日立製光電比色計により厚さ3.5mmのセル、500mμのフィルターを用いて透過率を測定した。Fig. 1はNO<sub>2</sub><sup>-</sup>含量と透過率との関係を図示したものである。

### B. 硝酸還元酵素作用力測定上の諸条件の検討

#### (1) 酵素液の調製

新鮮なるスサビノリ (*Porphyra yezoensis*) 25gをとり、蒸留水40cc、石英砂5gを加え、乳鉢にてよく搗碎した後綿布にて圧搾してえた汁液を遠心分離して沈澱を除き、上澄液に水を加えて50ccとする。

##### (a) 基質濃度の決定

基質濃度が高くなると硝酸還元酵素反応の速度は阻害され、又基質濃度が低い時は還元率が高いに拘らず還元生成物量が少く定量が困難となる。よつて還元生成物の量を最大にするための基質濃度を検討するため次の反応条件で実験を行つた。Fig. 2はその結果を示したものである。

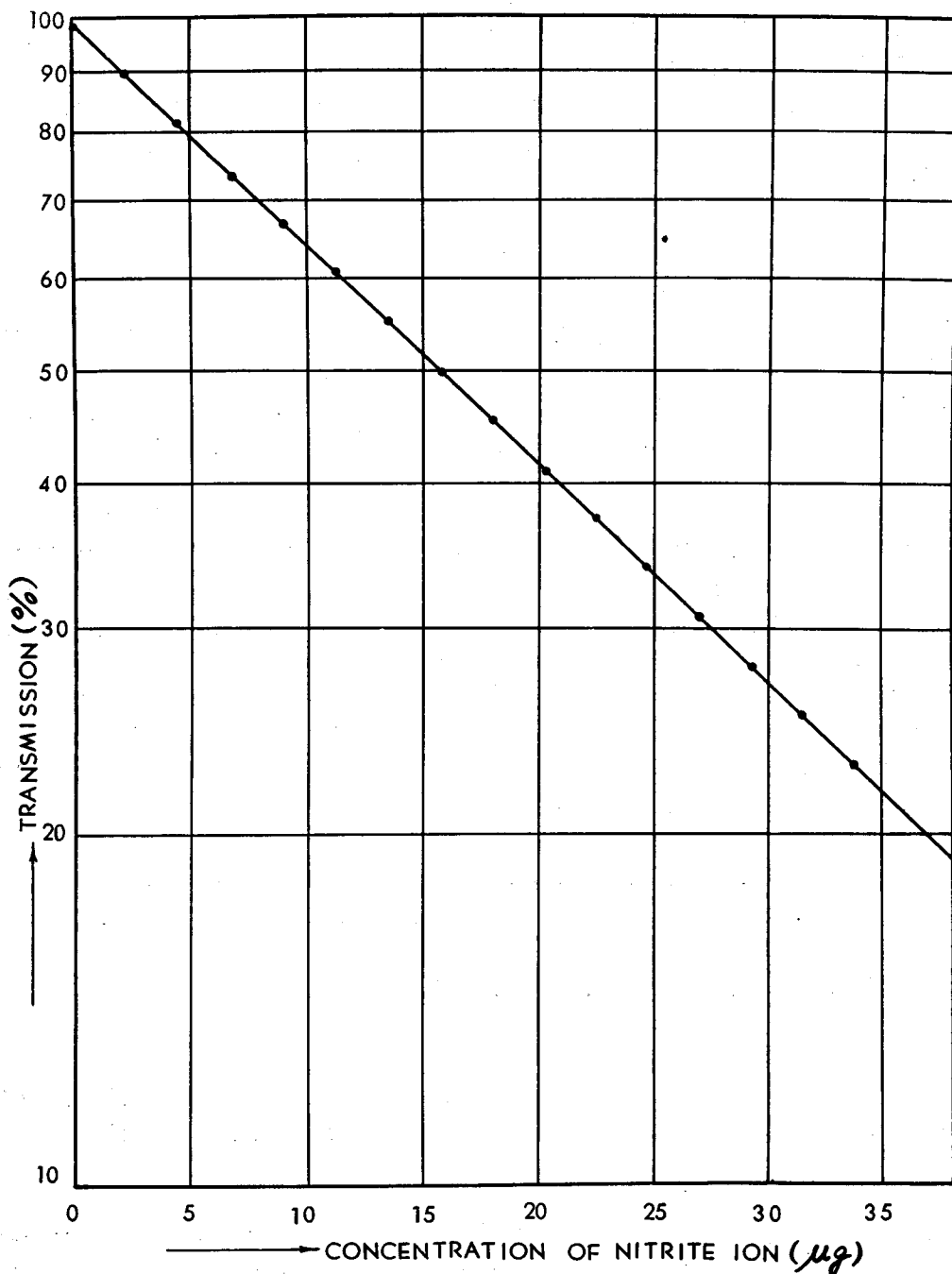


Fig. 1 Straight Line Relationship between the Concentration of Nitrite ion and Transmission, as measured with Cell of 3.5 mm and Filter of 500  $m\mu$

Composition of Exp. Solution	
pH 8.0 <sup>M/15</sup> Sørensen's Phosphate	
Buffer Solution	5 cc
0.4M Sodium Lactate Solution	1
Enzyme Solution	2
0.01M KNO <sub>3</sub> Solution	X
Water	Y
	Total 10cc
Temperature	20°C
Time	1 hour

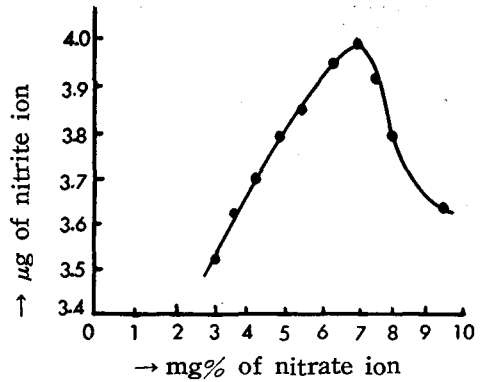


Fig. 2 The Effect of Concentration of Substrate on the Formation of Nitrite ion by the Nitrate Reductase in *Porphyra yezoensis*

Fig. 2 より反応液内における硝酸イオンの濃度を6.8 mg% にすれば生成する亜硝酸イオンの量は4 μg となり還元生成物の量が最大となる。従つて実験に當つて反応液量を10ccとする時は0.011M KNO<sub>3</sub> 1ccを加うればよいわけである。

(b) 水素供与体濃度の決定

渡辺<sup>(15)</sup> はさきに海藻の脱水素酵素について研究し、Lactic acid に対して広く作用することを認め、Sodium Lactate を用いることにした。Sodium Lactate 濃度が高くなると反応は阻害され、又低濃度の時も反応量は小となる故にこれを最大ならしめるような Sodium Lactate 濃度を選ばねばならない。これを検討するために行つた実験の反応条件とその結果は次の如くである。

Composition of Exp. Solution	
pH 8.0 <sup>M/15</sup> Sørensen's Phosphate	
Buffer Solution	5 cc
0.011M KNO <sub>3</sub> Solution	1
Enzyme Solution	2
0.4M Sodium Lactate Solution	X
Water	Y
	Total 10cc
Temperature	20°C
Time	1 hour

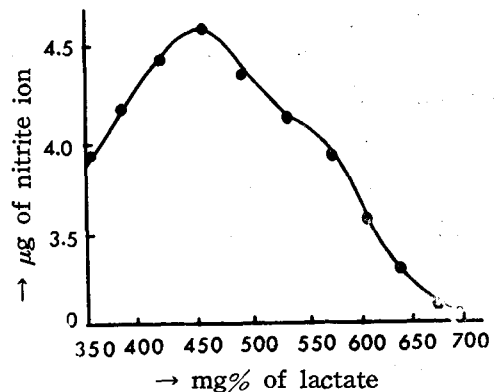


Fig. 3 The Effect of Concentration of Hydrogen Donator on the Formation of Nitrite ion by the Nitrate Reductase in *Porphyra yezoensis*

Fig. 3 より Sodium Lactate 濃度の増加につれて反応量は大きくなり、Lactate の濃度が462.8 mg% のとき生成される亜硝酸イオンの量は最大となり、それより高濃度では反応量は却つて減少した。従つて定量には反応液量を10ccとし、その中へ0.52M Sodium Lactate 1ccを加うればよいわけである。

(c) pH値の決定

従来の報文<sup>(16)(17)</sup>によれば硝酸還元酵素の Opt. pH は 7.4~7.8 附近であるが、之を確かめるために  $M/15$  Sørensen's Phosphate Buffer Solution を用いて pH の高下による反応量を実験してみた。そのときの反応条件及び実験結果は次の如くである。

Composition of Exp. Solution	
$M/15$ Sørensen's Phosphate Buffer Solution (various pH)	5 cc
0.011M $KNO_3$ Solution	1
0.52M Sodium Lactate Solution	1
Enzyme Solution	2
Water	1
	Total 10cc
Temperature	20°C
Time	1 hour

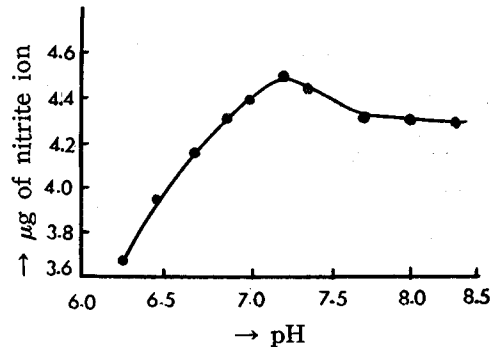


Fig. 4 The Effect of pH on the Formation of Nitrite ion by the Nitrate Reductase in *Porphyra yezoensis*

Fig. 4 より Opt. pH は 7.17 にあることを知つたので測定には pH 7.17  $M/15$  Sørensen's Phosphate Buffer Solution を用いることにした。

(d) 反応温度の決定

酵素反応も一般化学反応と同じく温度の影響を受けるが、海藻の硝酸還元酵素作用力測定に適当な温度を見出すために実験を行った。そのときの反応条件及び実験結果は次の如くである。もとより著者の一人(高木)<sup>(18)</sup> は海藻カタラーゼの最適温度決定に当り、反応時間によつて見掛けの最適温度を異にすることを認めたので、見掛けの最適温度が固有の最適温度となるためには反応時間によつて見掛けの最適温度を変えない点を求めねばならないのであるが、本実験では反応時間を1時間としてえられた見掛けの最適温度を以て測定に適當する温度を決定した。

Composition of Exp. Solution	
pH 7.17 $M/15$ Sørensen's Phosphate Buffer Solution	5 cc
0.011M $KNO_3$ Solution	1
0.52M Sodium Lactate Solution	1
Enzyme Solution	2
Water	1
	Total 10cc
Temperature various (0~40°C)	
Time	1 hour

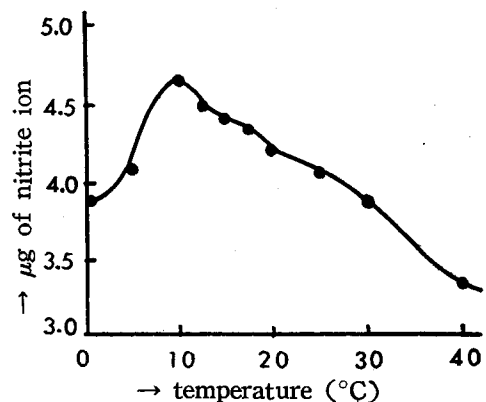


Fig. 5 The Effect of Temperature of Incubation on the Formation of Nitrite ion by the Nitrate Reductase in *Porphyra yezoensis*

Fig. 5 よりスサビノリを用いたときは最適温度は10°Cを示すが、海藻一般の硝酸還元酵素作用力測定には種々の点を考慮して反応温度20°Cを採用することにした。

(e) 反応時間の決定

従来の報文<sup>(16)(17)</sup>によれば硝酸還元酵素作用力測定の実験時間は1~2.5時間であるが、反応時間による亜硝酸イオンの生成量を知るために反応時間を変えて実験を行った。その時の反応条件及び実験結果は次の如くである。

Composition of Exp. Solution	
pH 7.17 M/15 Sørensen's Phosphate	
Buffer Solution	5 cc
0.011M KNO <sub>3</sub> Solution	1
0.52M Sodium Lactate Solution	1
Enzyme Solution	2
Water	1
	Total 10cc
Temperature	20°C
Time	various (¼~3hours)

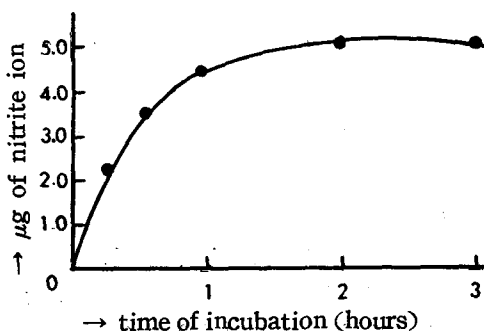


Fig. 6 The Effect of Time of Incubation on the Formation of Nitrite ion by the Nitrate Reductase in *Porphyra yezoensis*

Fig. 6 より反応時間の長くなるにつれて亜硝酸イオンの生成量は増大するが1時間以上ではその傾向はきわめて僅かである。従つて測定には1時間で充分である。

(f) 酵素濃度

以上の実験によつて測定の実験条件を決定したが、この条件において酵素量が作用力に比例するか否かを明らかにすることが必要である。これを確かめるため次の実験を行った。そのときの反応条件並びに実験結果は次の如くである。

Composition of Exp. Solution	
pH 7.17 M/15 Sørensen's Phosphate	
Buffer Solution	5 cc
0.011M KNO <sub>3</sub> Solution	1
0.52M Sodium Lactate Solution	1
Enzyme Solution	X
Water	Y
	Total 10cc
Temperature	20°C
Time	1 hour

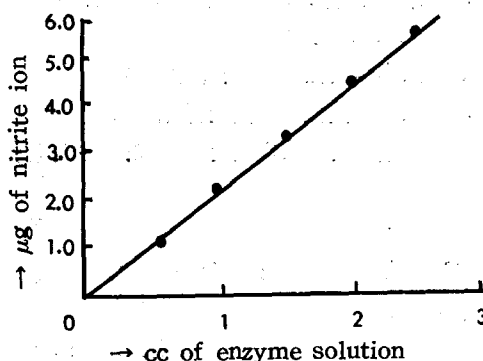


Fig. 7 The Effect of Concentration of Enzyme on the Formation of Nitrite ion by the Nitrate Reductase in *Porphyra yezoensis*

Fig. 7 よりこの範囲の亜硝酸イオンの生成量では酵素濃度と反応量とは比例する。故に本測定条件

は硝酸還元酵素作用力の測定に用いる。

### C. 硝酸還元酵素作用力測定法の決定

以上に行つた実験の結果に基づいて硝酸還元酵素作用力測定法を次の如く決定した。

#### Composition of Exp. Solution

pH 7.17 <sup>M/15</sup> Sørensen's Phosphate Buffer Solution	5 cc
0.011M KNO <sub>3</sub> Solution	1
0.52M Sodium Lactate Solution	1
Enzyme Solution	2
Water	1
<hr/>	
Total	10cc

この反応液を 20°C, 10mm 以下の真空度で 1 時間反応させたのち, 20% Trichloroacetic acid 0.5cc, 酸性白土 1g を加え, はげしく振盪し, 遠心分離すると無色清澄なる上澄液をうる。これを濾過して上澄液を分取し, Griess-Ilosvay 試薬 2cc を加え, 40°C, 15 分間加温して生ずる桃色の色調を光電比色計により 3.5mm のセル, 500m $\mu$  のフィルターを用いて透過率を測定し, これをさきに示した NO<sub>2</sub>-透過率標準直線図より生成された亜硝酸イオン量を求め, これを以て硝酸還元酵素作用力を表わすことにした。而してこの測定法を各種海藻の硝酸還元酵素作用力測定に適用する。

### 要 約

スサビノリを用いて硝酸還元酵素作用力の測定条件を吟味し, 測定法を実験によつて決定した。

1. 基質濃度即ち硝酸イオンの濃度は 6.82mg% が最適であり, 反応液を 10cc とするときは 0.011 M KNO<sub>3</sub> 1cc を加うれば充分である。
2. 水素供与体としての Lactate の濃度は 462.8 mg% が最適であり, 反応液を 10cc とするときは 0.52M Sodium Lactate 1cc を加うれば充分である。
3. 最適水素イオン濃度は pH 7.17 であり, 従つて pH 7.17<sup>M/15</sup> Sørensen's Phosphate Buffer Solution 5cc を加える。
4. 反応温度は 20°C を採用する。
5. 反応時間は 1 時間を採用する。
6. 酵素濃度は反応液を 10cc とするときは 2cc 加えることにする。

### 文 献

- (1) W. Thomas : Science, 66, 115 (1927)
- (2) G. T. Nightingale & W. R. Robbins : New Jersey Agr. Expt. Sta. Bull. 472 (1928)  
————— & L. G. Schermerhorn : ibid. 476 (1928)
- (3) H. Burström : Ann. Royal Agr. College of Sweden, 13, 1 (1946) ; 6, 1 (1937)
- (4) S. Eckerson : Botan. Gaz., 77, 377 (1924)  
————— : Contrib. Boyce Thomp. Inst., 3, 405 (1931) ; 4, 119 (1932)
- (5) A. L. Somner : Plant Physiol., 11, 429 (1936)
- (6) An unpublished paper by B. Arreguin cited in Plant Biochemistry.

- (7) W. Dittrich : *Planta*, 12, 69 (1930)
- (8) D. Michlin : *Biochem. Z.* 202, 329 (1928)
- (9) ——— & B. Severin : *ibid.* 237, 339 (1931)
- (10) L. H. Stickland : *Biochem. J.*, 25, 1543 (1931)
- (11) 江上不二夫, 佐藤了 : *日化誌* 68, 39 (1947); 69, 160 (1948); 70, 297 (1949)  
——— : *Bull. Chem. Soc. Japan*, 22, 137 (1949)
- (12) 高木光造 : *日水誌*, 18, 483 (1953); 19, 798 (1953)
- (13) 須田暁次 : *海洋科学*, 古今書院 (1943) p. 341
- (14) W. A. P. Black & E. T. Dewar : *J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom* 28, 673 (1949)
- (15) A. Watanabe : *Acta Phytochim.*, 15, 129 (1949)
- (16) M. Ohara & T. Suyama : *Nature*, 169, 285 (1952)
- (17) S. Yamagata : *Acta Phytochim.*, 10, 283 (1938); 11, 145 (1939)
- (18) 高木光造 : *日水誌*, 19, 803 (1953)

(水産科学研究所業績 第200号)