HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海藻の窒素同化機構に関する研究－Ⅶ：硝酸還元酵素に対する阻害剤の影響
Author(s)	高木, 光造; 村田, 喜一
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 6(1), 29-32
Issue Date	1955-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22910
Type	departmental bulletin paper
File Information	6(1)_P29-32.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

海藻の窒素同化機構に関する研究—Ⅶ

硝酸還元酵素に対する阻害剤の影響

高木光造・村田喜一
(北海道大学水産学部水産食品化学教室)

Studies on the Mechanism of Nitrogen Assimilation in Marine Algae—Ⅶ

Effect of various inhibitors on nitrate reductase

Mitsuzo TAKAGI and Kiichi MURATA

Abstract

The effect of various inhibitors on the nitrate reductase activity of *Ulva pertusa* and *Enteromorpha Linza* has been examined. The results obtained are summarized as follows:

The activity is inhibited markedly by 10^{-3}mol concentration of potassium cyanide and hydroxylamine, but no inhibition is observed at any concentration of potassium fluoride. From the fact that nitrate reductase activity is inhibited by potassium cyanide and hydroxylamine, it may be considered to have a metal constituent.

In addition, nitrate reductase activity is also inhibited by monojodacetic acid, specific inhibitor to the enzymes containing sulfhydryl group. This fact seems to indicate that the inhibition would extend to lactic dehydrogenase, another position in the enzyme system in which nitrate reductase takes part.

Experiments whether the inhibition of nitrate reductase with monojodacetic acid is restored or not by adding cysteine have been tried, but frustrated in this plan on account of the disturbance by excessively addition of cysteine to the point of causing the color reaction resulting from nitrite ion.

海藻は海水中の硝酸塩を窒素源として利用しているに拘らず硝酸還元酵素の存在，性質及びそれらの窒素源を基にして複雑な含窒素有機物を体内で合成する機構については未だ明らかでない。著者[1]等は海藻における硝酸還元酵素の存在を確認し，引続きその性質について究明してきたが，本報においては硝酸還元酵素の本態並びに酵素系を明らかにする目的で各種阻害剤による阻害実験を試みたのでその結果を報告する。

実験方法

(1) 硝酸還元酵素液の調製

前報[1]に記載した方法による。

(2) 硝酸還元酵素の阻害実験法

Thunberg tube	Composition of exp. solution	
Side chamber	-0.011M KNO_3 solution	1cc
	-0.52M Sodium lactate solution	1
Main chamber	-$^{M}/_{15}$ Sørensen's phosphate buffer solution	5
	-Enzyme solution	2
	-Inhibitor solution	1
		Total 10cc

昭和30年4月　日本水産学会年会（東京）に於て講演

阻害剤としてはKCN, NH_2OH, ICH_2COOH及びKFの1～10^{-5}M溶液を1cc宛反応液中に加えた。かくするときは阻害剤の濃度は反応液に対し10^{-1}～10^{-6}Mとなる。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% Trichloracetic acid 0.5cc, 活性白土1gを加え，はげしく振盪したのち遠心分離してえられる上澄液を分取し，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透過率を測定し，それより生成された亜硝酸イオン量を求め，阻害剤を加えないときの亜硝酸イオン量と対比して阻害率(%)を求めた。

実 験 結 果

A．各種阻害剤による阻害作用

試料はアナアオサ (*Ulva pertusa*) 及びウスバアオノリ (*Enteromorpha Linza*) でえられた結果をFig. 1～2に示した。

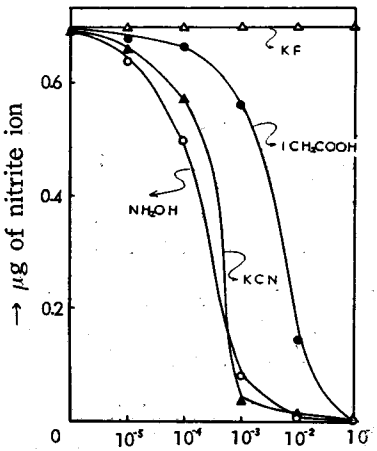

Fig. 1. Inhibition of nitrate reductase in *Ulva pertusa* by various concentrations of inhibitors

▲—▲ KCN　　○—○ NH_2OH
●—● ICH_2COOH　　△—△ KF

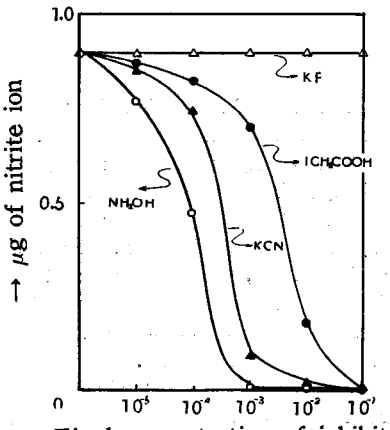

Fig. 2. Inhibition of nitrate reductase in *Enteromorpha Linza* by various concentrations of inhibitors

▲—▲ KCN　　○—○ NH_2OH
●—● ICH_2COOH　　△—△ KF

これを阻害剤を加えないときの亜硝酸イオン量と対比して各阻害剤の10^{-3}及び10^{-2}M溶液における阻害率を求めてTable 1に示した。

Table 1. Per cent of inhibition of nitrate reductase activity in *Ulva pertusa* and *Enteromorpha Linza* by 10^{-3} and 10^{-2} mol concentration of inhibitors

Species	*Ulva pertusa*								*Enteromorpha Linza*							
Inhibitors	KCN		NH_2OH		ICH_2COOH		KF		KCN		NH_2OH		ICH_2COOH		KF	
Final concentration (M/L)	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-2}
Inhibition (%)	94	97	88	100	19	83	0	0	90	98	100	100	22	80	0	0

即ちTable 1に示される如くアナアオサ，ウスバアオノリいずれにおいても硝酸還元酵素作用はKCN, NH_2OH及びICH_2COOHによつて阻害されたが，KFによつては全く阻害されなかつた。而してKCN,

NH_2OH は10^{-3}Mで酵素作用を著しく阻害するが，ICH_2COOH は10^{-3}Mではあまり阻害せず，10^{-2}Mにおいて酵素作用を著しく阻害する。

KCN，NH_2OH によつて阻害されることから硝酸還元酵素は一種の金属酵素であることが解る。又同時にSH酵素の特異阻害剤である ICH_2COOH によつても酵素作用が阻害されたが，これは硝酸還元酵素の阻害剤と考えるよりはむしろ硝酸還元酵素の関与する酵素系の他の部分即ち脱水素酵素の作用を阻害したものと思われる。

B．ICH_2COOH による阻害作用の Cysteine 添加による賦活

ICH_2COOH によるSH酵素の阻害作用は Cysteine の添加により賦活されることが知られているので，硝酸還元酵素系にある脱水素酵素作用を阻害すると思われる ICH_2COOH の阻害が Cysteine の添加により賦活されるならば亜硝酸イオンの生成量が増加する筈である。この意図の下にウスバアオノリの硝酸還元酵素液に ICH_2COOH を加えて1時間反応を阻害させたのち，2倍濃度の Cysteine を添加したものとしなかつたものについて亜硝酸イオンの生成量を比較した。

Table 2 はそのときの実験結果を示したもので，Fig. 3 はこれを図示したものである。

Table 2. Inhibition of nitrate reductase in *Enteromorpha Linza* by monojodacetic acid and its restoration by cysteine

No.	Final concentration of ICH_2COOH (M/L)	Concentration of cysteine added (M/L)	Incubating time (hrs)	Transmission (%)	NO_2' produced (μg)
1	0	0	1	95.0	0.90
2	0	0	2	94.0	1.08
3	10^{-3}	0	1	95.7	0.70
4	10^{-3}	0	2	95.3	0.80
5	10^{-3}	2×10^{-2}	2	100	0
6	10^{-2}	0	1	98.3	0.18
7	10^{-2}	0	2	97.7	0.23
8	10^{-2}	2×10^{-1}	2	100	0
9	10^{-1}	0	1	100	0
10	10^{-1}	0	2	100	0
11	10^{-1}	2×1	2	100	0

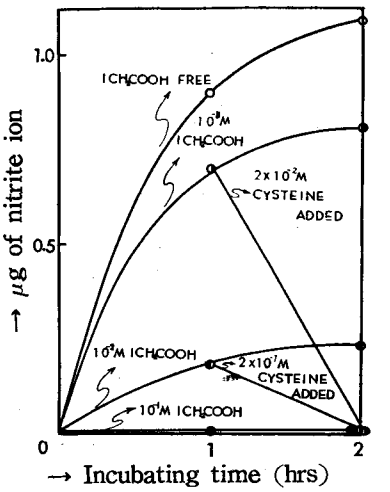

Fig. 3. Inhibition of nitrate reductase in *Enteromorpha Linza* by monojodacetic acid and its restoration by cysteine

Fig. 3 に示される如く Cysteine を添加したものはいずれも亜硝酸イオンの生成量が増加しないのみでなく，却つて0になつた事実から Cysteine そのものが Griess—Ilosvay 試薬による亜硝酸イオンの呈色反応を阻害したものと考えられる。

考　　察

海藻の硝酸還元酵素作用がジャガイモの塊茎のアルデヒド脱水素酵素[2]や，大豆のモヤシの乳酸脱水素酵素[3]の如く，海藻の脱水素酵素が単独で硝酸塩を亜硝酸に還元するのか，或いは江上等[4]の云う如く硝酸還元酵素が存在して蟻酸，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中間水素伝達体を経て最後の水素受容体である硝酸への水素の授受を触媒するのかについての間接的証明として各種阻害剤による阻害実験を行つた。

その結果硝酸還元酵素作用はKCN及びNH_2OHでは10^{-3}M濃度で著しく阻害され，ICH_2COOHでは10^{-3}M濃度で阻害は僅かであり，10^{-2}Mに至つて著しく阻害が認められたが，KFでは如何なる濃度においても阻害が全く認められなかつた。渡辺[5]はさきに海藻の脱水素酵素について研究し，このものは5%Ethylurethanによつて阻害が起るが，10^{-2}M KCN, NaF及び10^{-3}M ICH_2COOHによつて起らないことを認めている。

故に著者等の実験結果から10^{-2}M KCNにて阻害されるような本来の意味での硝酸還元酵素の存在することを容易に推定しえられる。而して KCN, NH_2OHによつて阻害されることから海藻の硝酸還元酵素は一種の金属酵素であると推定される。

更に江上等[4]によると大腸菌の硝酸還元酵素は重金属酵素であつて恐らくは鉄酵素であろうと推定し，又A. Nason,[6][7,8] H. J. Evans等[8]は最近植物の硝酸還元酵素について研究し，*Neurospora crassa*及び大豆の葉から硝酸還元酵素を抽出し，いずれもFAD及び恐らくはMoを含む金属酵素であつてTPNの還元型（大豆の葉の酵素ではDPNでもよい）とNO_3イオンの間に作用すると述べている。海藻の硝酸還元酵素が如何なる金属を含む酵素であるかは未知であるが，今後本酵素の単離精製を行つてこの点を究明したいと考えている。

要　　約

アナアオサ及びウスバアオノリの硝酸還元酵素作用力に及ぼす種々阻害剤の影響を実験し，次の結果をえた。即ち酵素作用力は10^{-3}M KCN及びNH_2OHによつて著しく阻害されるが，KFによつては如何なる濃度においても阻害されない。KCN及びNH_2OHによつて阻害されることから一種の金属酵素であろうと示唆した。

又SH酵素の特異阻害剤であるICH_2COOHによつても阻害されるが，これは硝酸還元酵素の関与する酵素系の他の部分即ち乳酸脱水素酵素を阻害するものと推定した。硝酸還元酵素のICH_2COOHによる阻害がCysteineにより賦活されるか否かを試みたが成功しなかつた。

文　　献

1) 高木光造・村田喜一 (1954). 北大水産彙報 **4**, 296；**4**, 306；**4**, 310；**5**, 173；**5**, 176.
2) Michlin, D. (1928). *Biochem. Z.* **202**, 329.
3) ———— & Severrin, B. (1931). *Ibid.* **237**, 339.
4) 江上不二夫・佐藤了 (1947). 日化誌 **68**, 39；(1948). **69**, 160；(1949). **70**, 297；(1949). *Bull. Chem. Soc. Japan* **22**, 137.
5) Watanabe, A. (1949). *Acta Phytochim.* **15**, 129.
6) Nason, A. & Evans, H. J. (1953). *J. Biol. Chem.* **202**, 655.
7) Nicholas, D. J. D., Nason, A. & McElroy, W. D. (1954). *Ibid.* **207**, 341.
8) ————&———— (1954). *Ibid.* **207**, 353.