HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	海藻の窒素同化機構に関する研究－Ⅷ：硝酸還元酵素の中間水素伝達体に就て
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, 6(1), 33-36
Issue Date	1955-05
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/22911
Type	departmental bulletin paper
File Information	6(1)_P33-36.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—VIII
硝酸還元酵素の中間水素伝達体に就て

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—VIII
On the electron carrier of nitrate reductase in *Porphyra yezoensis*

Mitsuzo TAKAGI and Kiichi MURATA

Abstract

Experiments were made to ascertain whether methylen blue, coenzyme 1(DPN) and cytochrome C are able or unable to fulfil a specific function as an electron carrier of nitrate reductase in ***Porphyra yezoensis.*** The results obtained are summarized as follows:

1. Methylen blue can stand as a representative of an electron carrier of nitrate reductase.
2. Cytochrome C is one of the real electron carriers of nitrate reductase.
3. Coenzyme 1(DPN) is not separately able to act as an electron carrier of nitrate reductase.

硝酸還元酵素の中間水素伝達体としては，水素供与体や菌の種類によつていろいろのものが使われるが，CoI (DPN) や yellow enzyme (Flavoproteid)，更に少くとも大腸菌においては Cytochrome b_1 などが関与している事実が明らかにされた。

又丹羽・佐藤等[1]は大腸菌による硝酸の還元には少くとも2種の酵素の協力が必要で，その一つは還元基質に対する脱水素酵素であり，他の一つは硝酸還元酵素であつてこの二つの酵素の間に山県の説く如く Mb (methylen blue) で代用しうるような何らかの中間水素伝達体の存在することを述べている。

著者等の実験においてもほゞ同様の機作によつて硝酸の還元が行われることが予想されたので，Mbが大腸菌の場合と同様に硝酸還元酵素の中間水素伝達体の役目を代用しうるか，又アサクサノリ(***Porphyra tenera***)中に Cytochrome C の存在が薬師寺[2]により指摘確認されているので，Cytochrome C が海苔における硝酸還元酵素の真の中間水素伝達体となりうるか，更に又乳酸脱水素酵素の助酵素である CoI の添加により海苔の硝酸還元酵素作用力の増進が見られるか，これらの点について検討した結果を報告する。

実験方法

(1) 硝酸還元酵素液の調製

前報[3]に記載した方法による。

(2) 硝酸還元酵素作用力測定法

前報[3]に記載した方法による。

実験結果

A．硝酸還元酵素に対する Mb の影響

昭和30年4月　日本水産学会年会（東京）に於て講演

供試海藻は6月3日，七重浜にて採取したスサビノリ（*Porphyra yezoensis*）を用いた。又Mbの濃度は 2×10^{-4}M 溶液を用い，その量を変えて反応液に加えたときの実験結果を Table 1 に示した。

Table 1. Effect of graded amounts of methylen blue on nitrate reductase activity of *Porphyra yezoensis*

Side chamber	0.011M KNO_3 soln.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0.52M Sodium lactate soln.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Main chamber	pH 7.17 $^{M}/_{15}$ Sørensen's phosphate buffer soln.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Enzyme soln.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Methylen blue (2×10^{-4}M)	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
	Water	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1
Transmission (%)		90.1	89.8	89.5	89.0	88.3	88.2	88.5	89.5	90.0	90.1
NO_2' produced ($\mu g/1h$)		2.08	2.18	2.25	2.40	2.60	2.63	2.55	2.25	2.10	2.08

Table 1 によつて示される如く Mbはスサビノリ硝酸還元酵素の中間水素伝達体の役目を代用しうることが解る。しかも反応液を10ccとするとき Mb の最適濃度は 2×10^{-4}M 溶液 0.5ccを添加したときで，このとき生成された亜硝酸イオンの量は最大となつた。

次に硝酸還元酵素の水素供与体として，乳酸ソーダの代りにコハク酸，リンゴ酸，クエン酸，グリシン，L-グルタミン酸を用い，2×10^{-4}M の Mb 0.5ccを添加したときとしなかつたときの亜硝酸イオンの生成量を検してみた。その結果を Table 2 に示した。

Table 2. Effect of methylen blue on nitrate reductase activity of *Porphyra yezoensis* when use is made of succinic-, malic-, citric acid, glycine and L-glutamic acid instead of sodium lactate as hydrogen donator

Side chamber	0.011M KNO_3 soln.	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	0.2M Hydrogen donators	Succinic acid		Malic acid		Citric acid		Glycine		L-Glutamic acid	
		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Main chamber	pH7.17 $^{M}/_{15}$ Sørensen's phosphate buffer soln.	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	Enzyme Soln.	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Methylen blue (2×10^{-4}M)	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
	Water	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5
Transmission (%)		96.0	94.8	96.5	96.5	99.0	99.0	99.0	99.0	98.0	98.0
NO_2' produced ($\mu g/1h$)		0.60	0.92	0.45	0.45	0.05	0.05	0.05	0.05	0.17	0.17

Table 2 によつて示される如く，コハク酸を水素供与体として用いたときにはMbは乳酸ソーダと同様に硝酸還元酵素の中間水素伝達体となりえたが，リンゴ酸，クエン酸，グリシン及びL-グルタミン酸に対しては明確には認められなかつた。

B. 硝酸還元酵素の真の中間水素伝達体について

薬師寺[2]は生海苔（*Porphyra tenera*）5 Kgから Cytochrome C 1 gを結晶状に分離した。今仮りにその収量を50%とすると著者等が実験に用いる酵素液 2 cc中には Cytochrome C 約 0.4mg を含むことになる。従つ

て今 Cytochrome C の10^{-3}M 溶液を作製して反応液中に0.2ccを加えると上記 Cytochrome C 量の約6倍量を反応液中に新たに添加したことになる。この考えの下に Cytochrome C の 10^{-3}M 溶液 0.2cc を反応液に加えた。この際同時に等MのCo I 及び前記 2×10^{-4}Mの Mbをもいろいろの組合せで加えてこれらが酵素系に関与するか否かを検討した。そのときの実験結果をTable 3に示した。

Table 3. Effect of methylen blue, Co I (DPN) and cytochrome C on nitrate reductase activity of *Porphyra yezoensis*

Side chamber	0.011M KNO_3 soln.	1	1	1	1	1	1	1	1
	0.52M Sodium lactate soln.	1	1	1	1	1	1	1	1
Main chamber	pH7.17 M/15 Sφrensen's phosphate buffer soln.	5	5	5	5	5	5	5	5
	Enzyme soln.	2	2	2	2	2	2	2	2
	Methylen blue (2×10^{-4}M)	—	—	0.5	—	0.5	0.5	—	0.5
	Coenzyme I (1×10^{-3}M)	—	0.2	—	—	0.2	0.2	0.2	—
	Cytochrome C (1×10^{-3}M)	—	—	—	0.2	—	0.2	0.2	0.2
	Water	1	0.8	0.5	0.8	0.3	0.1	0.6	0.3
Transmission (%)		90.0	90.0	88.5	88.0	88.5	88.5	88.0	88.5
NO_2' produced (μg/1h)		2.10	2.10	2.55	2.70	2.55	2.55	2.70	2.55

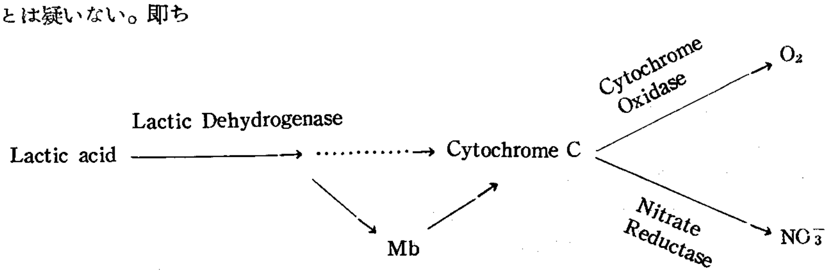
Table 3に示される如く Co I によつてスサビノリの硝酸還元酵素作用力は増加しないことが解る。而してこれは Co I が単独では海藻の乳酸脱水素酵素の助酵素即ち硝酸還元酵素の中間水素伝達体になりえない事実を意味すると思うが，Co I がこの場合の反応液中に充分含まれていたことによつて，これを新たに添加してもその効力を示さなかつた事も考えられるからこの点は尚吟味の余地があると思われる。

然しながら Mb は前の実験同様に硝酸還元酵素の中間水素伝達体の役目を代用しうることは明らかであり，又 Cytochrome C がスサビノリ硝酸還元酵素の真の中間水素伝達体となりえたので，恐らくこのものがアマノリの窒素同化に実際に関与しているものと思われる。

考　　察

乳酸から脱水素されるときの水素受容体としては従来 Co I (DPN)をとるもの(筋肉の場合)と Cytochrome をとるもの（酵母の場合）との二つの型に限られている。従つて乳酸から脱水素される海藻の硝酸還元酵素系には *Neurospora crassa* の如く Co II (TPN) の関与は考えられない。

著者等は本実験において海藻の硝酸還元酵素は Co I によつては確定的でないが，Mb, Cytochrome C によつてその作用力を増加する事実を認めたことから海藻の乳酸脱水素酵素は酵母と同じ型をとるものではなかろうかと思われる。而して Green, Stickland & Tarr[4] は乳酸から脱水素される硝酸還元酵素系に Cytochrome C が関与しないと述べているが，著者等の実験事実より海藻の硝酸還元酵素系に Cytochrome C が関与していることは疑いない。即ち



最近 A. Nason, H. J. Evans[5] は *Neurospora crassa* から硝酸還元酵素を抽出し，補欠分子族として FAD (Flavin adenine dinucleotide) を含む Mo酵素であつて Co II の還元型と NO_3 イオンとの間に作用すると述べている。即ち

$$NO_3^- + TPNH + H^+ \xrightarrow{\text{Nitrate Reductase}} NO_2^- + TPN^+ + H_2O$$

更に同氏等[6] は FAD (FMNをも含む) 及び Mo が TPN の還元型から NO_3 イオンに水素が渡される径路に存在して硝酸還元酵素の中間水素伝達体の役目を果すことを提案した。即ち

$$TPNH \longrightarrow FAD\ (or\ FMN) \longrightarrow Mo \longrightarrow NO_3^-$$

一方辻村等[7] は広く海藻中に Flavin の存在を認め，各種海藻中の Flavin 含量を定量して特にアマノリ類に多く含まれることを証しているし，荻野[8] や著者の一人(高木[9])は海藻中に有機塩基として Adenineの広く存在することを認めているので各種海藻中に FAD が存在し，硝酸還元酵素系に実際に関与しているであろうことは充分可能性のあるところである。

従つて海藻の硝酸還元酵素系に果して FAD や Mo が関与するか否かについては今後実験的に究明したいと考えている。

要　　約

Mb, Co I 及び Cytochrome C がスサビノリの硝酸還元酵素の中間水素伝達体になりうるか否かを実験し，次の事を明らかにした。

1. Mb は硝酸還元酵素の中間水素伝達体の役目を代用しうる。
2. Cytochrome C が硝酸還元酵素の真の中間水素伝達体である。
3. Co I は単独では硝酸還元酵素の中間水素伝達体となりえない。

本研究の遂行に当り種々貴重な助言を賜つた本学部斎藤恒行教授に深甚なる謝意を表する。

文　　献

1) 丹羽　允・佐藤　了・谷口茂彦 (1951). 酵素化学シンポジウム **6**, 40.
2) Yakushiji, E. (1938). *Phytochim.* **8**, 5328.
3) 高木光造・村田喜一 (1954). 北大水産彙報 **4**, 296.
4) Green, D. E., Stickland, L. H. & Tarr, H. L. A. (1934). *Biochem. J.* **28**, 1812.
5) Nason, A. & Evans, H. J. (1953). *J. Biol. Chem.* **202**, 655.
6) Nickolas, D. J. D. & Nason, A. (1954). *Ibid.* **211**, 183.
7) 辻村みちよ・田部井菊子・和田つる (1952). 農化 **26**, 11.
8) 荻野珍吉 (1941). 日水誌 **10**, 156; (1943). **12**, 48.
9) 高木光造 (1952). 北大水産彙報 **2**, 297.