- Biol. Chem.*, 141, 495 (1941).
- (4) L. G. Sherrington, C. H. Gentry : *Analyst*, 70, 460 (1945).
- (5) T. V. Ass, G. N. Bylinko : *C. A.*, 33, 4615 (1939).
- (6) K. Bambach, T. H. Rider : *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 7, 165 (1935).
- (7) 上尾庄次郎, 阪本秀策 : 薬学雑誌, 58, 711 (1938).
- (8) A. J. Berry, P. J. Durrant : *Analyst*, 55, 615 (1930).
- (9) 三宅泰雄 : 気象, II, 185 (1938).
- (10) F. Sierra : *C. A.*, 45, 5060, 8937, 8938 (1951); 46, 379, 380 (1952); 47, 3172, 10404 (1953); 48, 502 (1954); J. H. Cañavate : *C. A.*, 47, 5301 (1953); F. Ramon, R. Sauchez : *C. A.*, 48, 6910 (1954).
- (11) 重松恒信 : 分析化学, 3, 273 (1954).
- (12) W. Schlenk : *Ann. d. Chem.*, 363, 313 (1908).
- (13) J. W. Ellms, S. J. Hauser : *Ind. Eng. Chem.*, 5, 913 (1913).
- (14) Beilstein's Handbuch der Organische Chemie., XIII, p. 241.
- (15) 正路倫之助 : pH の理論と測定法, p. 180 (丸善).
- (16) 高木誠司 : コルトフ容量分析の理論, p. 90 (南条書店).
- (17) Welcher : *Organic Analytical Reagents*, II, p. 471.
- (18) J. W. Ellms, S. J. Hanser : *Ind. Eng. Chem.*, 5, 913 (1913).

鶏 肝 臓 の 硝 酸 還 元 酵 素 (VI)*

硝酸塩による DPNH の酵素的酸化

大村 浩久, 箆 島 豊 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 34 年 11 月 14 日 受 理

動物組織による硝酸塩の還元は, キサンチン酸化酵素⁽¹⁾或はアルデヒド酸化酵素⁽²⁾の作用によると古くから主張されてきたが, 我々は必ずしも同じものとは考えられない事を示した⁽³⁾. しかしこれ迄研究してきた肝臓酵素標品ではアセトアルデヒドが不可欠の水素供与体であり^(4,5), 又酵素の細胞内挙動の追及^(6,7)からもアルデヒド酸化酵素の意義を無視する事は出来ない. 一方 DPN 及びフラビンも水素供与体としてアルデヒドに代り得て⁽⁵⁾然もアルデヒドの場合と異って還元生成物亜硝酸が引続いて作用される事は⁽⁸⁾, 微生物^(9,10)同様の等助酵素の関与を示唆するものであるが, 動物組織では未だ確認されていない. 最近我々はオキシマーゼの助酵素が DPN 及び FAD である事実⁽¹¹⁾に基づいて, 分光光度計による測定法を確立した⁽¹²⁾. 先にオキシム類による硝酸還元の阻害は少くもその一部は硝酸塩とオキシムとの拮抗作用によるものと推定したが⁽¹³⁾, ここにオキシマーゼ測定法を硝酸塩にも適用し微弱ながら DPNH の酸化 (以下 D-活性) が起る事を認めたので, 特にこれ迄追究してきたアルデヒド酸化酵素共軛系 (A-活性)^(4,5) との相異について先ず検討した.

実 験 及 び 結 果

NO₃ による DPNH の酸化 新鮮肝臓 30 g を pH 7.5 の M/10 磷酸緩衝液 90 ml に磨砕懸濁し, 時々攪拌しながら 30° で 30 分間抽出し 3,000 r. p. m. で 10 分間遠心分離する. 上清を氷冷しアセトン濃度 33% 乃至 55% で沈澱する部分を集め, 57% アセトンで数回洗滌して約 5 g の標品を得た. この 1 g を水に分散し 5° の流水に対し 3 時間透析後遠心分離する. 沈澱を pH 7.5 の M/15 磷酸緩衝液 10 ml で抽出, 遠心分離して得た黄赤色透明上清を 20 ml として酵素液とした. 酵素は活性が弱く失活し易いので毎日調製した. こうして得た酵素液 1 ml 中に 100~120 r の蛋白-N が含まれる (銅-フォーリン試薬で測定). 遠心分離に冷凍遠心機を用いアセトン分別も -10° の低温で行うと水に溶け易い沈澱が得られる. この場合は 1 g を水 20 ml に溶かし流水透析後念のため遠沈して用いても差支えないが, 蛋白含量は高く 1 ml 当り 250~300 r でありそれ自体の吸光度も高かったが, 活性には前者と著しい差は認められなかった.

この酵素液での DPNH の減少をベックマン分光光度計を用い 340 mμ の吸収の変化で追及したが, 反応液の

* Nitrate Reductase of Fowl Liver. (VI). Enzymatic Oxidation of DPNH by Nitrates.

By Hirohisa OMURA and Yutaka OSAJIMA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)

硝酸還元酵素に関する研究 第 20 報

第 1 図 NO₃ による DPNH の酸化

反応液の組成: pH 7.5, 室温 (28°)

	DPNH mg/ml	TPNH mg/ml	FAD γ/ml	FMN γ/ml	酵 素 mg/ml	NaNO ₃ 10 ⁻³ M	磷酸緩衝 液, M/15 pH 7.5	H ₂ O
(1) 完全系	1.0	—	0.5	—	1.0	1.0	—	0.5
(2) -FAD	1.0	—	—	—	1.0	1.0	—	1.0
(3) -NO ₃	1.0	—	0.5	—	1.0	—	—	1.5
(4) -酵 素	1.0	—	0.5	—	—	1.0	0.5	1.0
(5) TPN	—	1.0	0.5	—	1.0	1.0	—	0.5
(6) TPN(-NO ₃)	—	1.0	0.5	—	1.0	—	—	1.5
(7) FMN	1.0	—	—	0.5	1.0	1.0	—	0.5

第 1 表 NO₃ 量の影響

NO ₃ 終濃度 (M)	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	0
吸光度減少	-0.088	-0.086	-0.089	-0.059	-0.028	-0.022

第 2 表 DPNH 量の影響

反応時間	吸 光 度					
0分	0.800		0.500		0.300	
	完全系	-NO ₃	完全系	-NO ₃	完全系	-NO ₃
30	0.620	0.774	0.381	0.474	0.262	0.280
減少	-0.180	-0.026	-0.119	-0.026	-0.038	-0.020

第 3 表 FAD の 影 響

FAD (r)	50	40	20	5	0
吸光度/完全系	-0.090	-0.100	-0.065	-0.024	-0.022
減少(-NO ₃)	-0.020	-0.018	-0.010	-0.007	-0.005

第 4 表 透析と FAD の 関 係

酵 素	アセトン沈澱			アセトン沈澱 -硫安沈澱
透析時間(時間)	0	1.5	8.0	3.5
吸光度 { 完全系	-0.118	-0.107	-0.112	-0.055
吸光度 { -FAD	-0.124	-0.093	-0.061	-0.009
減少 { -NO ₃	—	-0.012	—	-0.009

次に FAD の添加量は 40 r で十分であった (第 3 表)。之等の結果に基いて酵素液 1 ml, 10⁻³ M NaNO₃ 1 ml, FAD (100 r/ml) 0.4 ml, M/10 磷酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ml, H₂O 0.6 ml 混液に DPNH (mg/ml) 1 ml を添加し, 直ちに 340 mμ の吸光度を測定, 30 分後に再び測定してその減少量を求めた。分光器のセル内, 室温で測定すれば反応温度が一定せず特に冬期に於て著しく活性が低いので, 後述するように 30° の恒温器中で作用

組成及び結果を第 1 図に示す。DPNH は LePage 氏法でパン酵母から分離した純度 30% 前後の粗品⁽¹⁴⁾, TPNH は市販品 (Nutritional Biochemical Co., 99%) をそれぞれハイドロサルファイトで還元し⁽¹⁵⁾, HCl で pH 7.7 に中和, FAD は市販品 (ワカモト製薬, 90%) FMN は名城大学農学部近藤弘氏より恵贈されたもの (吸光度よりの純度 70%) を使用した。

こうして NO₃ 及び FAD を加えた完全系では DPNH が時間と共に減少し, FAD を除くと或る程度活性が低下, NO₃ を欠くと DPNH の酸化は更に弱い事が認められ, NO₃ が水素受容体として作用している事が推定される。併し酵素液には他の DPN 酵素も含まれ, 又その水素受容体を完全に除く事も出来ないで, 酵素を加えない場合より DPNH の減少量は多かった。従ってこの程度の粗酵素液では NO₃ を除いた盲験区を設けなければならない。之と共に, TPNH 及び FMN は全く効果が無い事も確められた。

次に特記する外は第 1 図の完全系に緩衝液を加え全量 5 ml としたものを用いて二三の条件を検討した。吸光度の減少は室温 (約 28°) 30 分間の値を示す。

NO₃ の量は勿論酵素活性にも支配されるが第 1 表に示すように 10⁻⁴ M で十分であってそれ以上増加しても効果はなく, 10⁻² M 以上で略々一定となる A 活性^(4,5) に比べて著しく低い。

吸収の変化は DPNH の量にも支配される事は第 2 表からも認められる。しかし光度計の構造から更に経済的理由も加味して反応開始時の吸光度を 0.5 附近とした。之は使用する DPN の純度にもよるが, 概略 1 mg で達成される。DPNH の調製はアルコール脱水素酵素を用いても差支えないが⁽¹⁶⁾, アルコールが残存すると測定中にも DPNH を再生し見掛け上活性を低下するため一般に化学的手段を用いた。

第 2 図 pH-活性曲線

第 5 表 空 気 の 影 響

空 気	—		+	
	完全系	—NO ₃	完全系	—NO ₃
反 応 系				
吸光度減少	—0.091	—0.016	—0.100	—0.016

第 6 表 反 応 温 度

反 応 温 度	20	25	30	35	40
吸光度 { 完全系	—0.018	—0.053	—0.125	—0.105	—0.045
減 少 { —NO ₃	—0.006	—0.011	—0.020	—0.021	—0.020

第 7 表 耐 熱 性

処 理 温 度	30	40	50	60	100
吸光度 { 完全系	—0.072	—0.043	—0.028	—0.025	+0.009
減 少 { —NO ₃	—0.027	—0.033	—0.032	—0.032	+0.003

温 (31°) で測定した。

pH の影響 A 活性の至適 pH は牛⁽⁴⁾, 廿日鼠⁽¹⁷⁾, 鶏⁽⁵⁾, 何れの肝臓酵素でも 5.8 乃至 6.0 であり, 更に鶏では 4.5 附近に第 2 のピークが認められた。之に対して D 活性は第 2 図のように 7.7 とむしろアルカリ側で強く, 又反応域も前者に比べてかなり狭い。DPNH は pH 7 以下では不安定であり, 他方 8 を越すと酵素液に濁りを生じて測定にも影響するので, 至適値附近で測定する事が望ましい。この場合 DPNH は 1% 重曹及び炭酸ソーダ中で還元し HCl で pH 7.7 にするのでかなり強い緩衝能を持つ。

温度の影響 A 活性は 55° 乃至 60° とかなり高温で最も強く作用し 70° でも認められるが, 実験の便宜上 40° で測定した^(4,5)。又之に伴ってキサンチン酸化酵素も同様に高温で作用する事を観察した⁽⁴⁾。然るに D 活性は低く 30° に最適値がある事は第 6 表から明らかである。又 A 活性に做ってホモゼネートを先ず 55° に 5 分間加熱してから酵素を調製すると作用力は見られず耐熱性も低い事を示唆する。第 7 表は之を示すものであって, 酵素液を流水透析後各温度に 5 分間保持した後 30° で活性を測定したが, 40° でも大部分の活性を失い 50° では完全に失活した。

酵素標品 使用した程度の酵素液には A 活性も含まれている事は常法⁽⁴⁾に従い, 40°, 2 時間作用させ生成し

第 8 表 D 酵素液中の A 活性

水素供与体, M/50	—	アセトアルデヒド
生成 NO ₂ , μM	5.1	8.5

第 9 表 A 酵素標品中の D 活性

反 応 系	完全系	—NO ₃
吸光度減少	—0.042	—0.013

第 10 表 凍結乾燥標品

反 応 系	完全系	—NO ₃	—酵素
吸光度減少	—0.063	—0.005	—0.003

させた。酵素活性は極めて弱く精製の問題があるが, 之を行うには一応の性質を知る必要があるので取敢ず本酵素液で研究を進めた。

FAD の効果 アルデヒド酸化酵素は FAD を含むが強く結合して単なる透析程度では除かれない⁽¹⁶⁾。之に関連し A 活性は FAD を加えても殆ど影響されず, 又逆にフラビンを水素供与体とした場合に認められた NO₂ の減少もアセトアルデヒドによって促進されなかった⁽⁸⁾。之に対して D 活性では FAD の効果がある事は第 1 図及び第 3 表から明白であって, D 活性に關与する FAD は離れ易い事を示唆するが第 4 表も之を示す。即ち FAD の効果は透析時間と共に顯著にない, 又酵素液を更に硫酸分別した 0.3 乃至 0.6 飽和沈澱については FAD を加えなければ活性は全く認められない。こうして肝臓酵素に於ても FAD が DPNH と NO₃ との中間水素伝達体として作用している事が

考えられる。

空気の影響 A 活性は好氣的には作用しないのでツンベルグ管を用い脱気して反応させなければならない^(4,5)。一方 D 活性は空気の影響は全く認められない。第 5 表は流動パラフィンで空気を遮断したものと比較試験であって, 分光器のセル中, 室

た NO₂ をグリース試薬で測定した第 8 表からも示される。又 A 活性酵素標品は硫酸分別と燐酸石灰ゲル処理を行って調製するが^(4,5), D 活性も含まれている事は第 9 表に示す通りである。但し 55° の予熱処理を行わず調製し約 1 ヶ月冷蔵したものであって 60 mg 宛使用した。

A 活性は減圧乾燥は勿論, 透析して硫酸を除いた後凍結乾燥しても完全に失活するため, 酵素標品は吸引濾過して脱水する程度の湿った状態に止めなければならない^(4,5)。之に対して D 活性は凍結乾燥して 1% 以下の水分含量とした標品にも認められた。ア

第 11 表 緩衝液の影響

緩 衝 液	終濃度 (M)	吸光度変化	
		完全系	-NO ₃
燐 酸	10 ⁻²	-0.072	-0.011
醋 酸	10 ⁻²	+0.014	+0.011
ト リ ス	10 ⁻²	+0.005	+0.020
ペロナル	10 ⁻²	+0.010	+0.014
ピロ燐酸	2×10 ⁻⁴	-0.045	-0.045
砒 酸	2×10 ⁻⁴	-0.030	-0.028
硼 酸	2×10 ⁻⁴	-0.035	-0.040

第 12 表 各種緩衝液の燐酸塩の効果に対する影響

緩 衝 液	吸光度減少	
	完全系	-NO ₃
燐 酸	-0.067	-0.013
燐酸+トリス	-0.040	-0.006
燐酸+ペロナル	-0.044	+0.002
燐酸+ピロ燐酸	-0.011	-0.006
燐酸+砒 酸	-0.010	-0.011
燐酸+硼 酸	-0.005	-0.005

第 13 表 燐 酸 の 効 果

濃 度, M	無添加	PO ₄ ''		SO ₄ ''
		2×10 ⁻⁴	2×10 ⁻²	2×10 ⁻²
吸光度 { 完全系	-0.007	-0.020	-0.077	+0.025
減 少 { -NO ₃	-0.003	-0.008	-0.015	+0.028

第 14 表 阻 害 剤 の 影 響

阻 害 剤, 10 ⁻³ M	KCN	NaN ₃	チオ尿素	尿酸	EDTA	モノヨード醋酸
阻 害 % { D 活性	66.0	0	22.5	23.8	62.7	0
{ A 活性	21.4	100	54.4	88.0	16.1	21.0

第 15 表 逐 次 還 元 系

基質, 10 ⁻⁴ M	NaNO ₃	NaNO ₂	Na ₂ N ₂ O ₂	NH ₂ OH	NH ₄ Cl	無添加
吸光度減少	-0.130	-0.159	-0.148	-0.149	+0.005	-0.025

第 16 表 反 応 生 成 物

基質, 10 ⁻³ M	NO ₃	NO ₂	N ₂ O ₂	NH ₂ OH	無添加
NO ₂ -N, γ	+0.7	-42.7	0	0	0
NH ₂ OH-N, γ	+0.4	+9.1	—	-20.4	0
NH ₄ ⁺ -N, γ	+24.5	+26.5	+22.5	—	+1.5

反応液: 酵素 1 ml, 5×10⁻³ M 基質 1 ml, M/2 燐酸緩衝液 (pH 7.7) 0.5 ml, FAD (100 γ/ml) 0.5 ml, DPNH (6 mg/ml) 1.5 ml, H₂O 0.5 ml, 全量 5.0 ml

第 14 表に A 活性のもの⁽⁵⁾も引用して比較する。酵素が不純なため厳密な比較は出来ないが、少くも D 活性は NaN₃ 及びモノヨード醋酸では阻害されない。KCN では酵素液に濁りを生じて分光器による測定値に影響を及ぼし、見掛け上の阻害がかなり異なるので別に盲験を設けてこの濁りを補正した。

逐次還元系 A 活性では還元生成物 NO₂ は引続き作用を受けることなく反応液中に集積する^(4,5)。之に対して D 活性は第 15 表に示すように NO₃ の他に微生物の酵素系について中間体である事が明らかにされた NO₂, N₂O₂ 及び NH₂OH によっても DPNH を酸化し得るが、最終生成物である NH₄⁺ は効果が無かった。

之等無機窒素化合物による DPNH の酸化は肝臓にも NO₃ から NH₄⁺ への還元系が存在する事を示唆するがその Stoichiometry の測定を要する。併し酵素の活性が弱い精製後に譲る事とし取敢ず定性的に反応生成物の検出を試みた。出来るだけ多くの反応生成物を得るため之迄の知見に基いて特に DPNH 量を増加し、反応組成を若干変更し 30° で 2 時間作用させた。5 分間加熱して反応を止め醋酸ウラニウムで除蛋白、6000 r. p. m. で

セトン沈澱を透析後凍結乾燥した標品 200 mg を 4 ml 燐酸緩衝液で抽出、遠沈上清 0.5 ml (蛋白-N, 約 360 γ) 宛を用いて測定した結果を第 10 表に示す。

緩衝液の影響 最近我々はアンモニア脱水素酵素を同じ肝臓標品で証明したが⁽¹⁸⁾、この場合緩衝液の選択が極めて重要であってトリス及びペロナルが有効であり、燐酸塩では全く活性が認められなかった。D 活性に於ても同様に緩衝液で影響される事は第 11 表に示す通りである。即ち -10° で調製したアセトン沈澱を水に溶した酵素液を用い之に pH 7.5 の種々の緩衝液を加えた反応系で活性を測定した。燐酸、醋酸、トリス、ペロナルは慣用のもの、ピロ燐酸はソーダ塩を HCl、砒酸及び硼酸は NaOH で中和して供試したが、この三者では吸収が特に大きくなるため濃度を減少した。結果は燐酸塩のみが有効であり、他の緩衝液では活性が全く認められなかった。これに反して A 活性では燐酸よりも醋酸緩衝液で活性が強く現われる事は既に報告した^(4,5)。

燐酸塩に他の緩衝液を混合した場合の活性を第 12 表に示すが、ピロ燐酸、砒酸、硼酸では活性が認められなくなり、トリス及びペロナルは殆ど影響しなかった。この場合緩衝液は 2 倍濃度のものを半量宛加えて反応液中の濃度は第 11 表の場合と同一にした。

これ等の事実は燐酸が D 活性に必須のものである事を示唆するが、第 13 表は之を裏付けるものであって燐酸を欠くと活性は現われなかった。Neurospora の硝酸還元酵素には PO₄''' を要し AsO₄''' 或は SO₄''' 等が之に代り得る事は既に Nicholas 氏等⁽¹⁹⁾によって報告されているが、肝臓では砒酸或は硫酸イオンの効果は認められなかった。第 13 表で SO₄''' は燐酸緩衝液の代りに硫酸溶液を加えたが、既述のように DPNH 溶液の持つ緩衝能によって反応の pH は保持された。又吸光度の増加は NH₄⁺ の酸化⁽¹⁸⁾によるものと推定される。

阻害剤 若干の阻害剤による阻害度を

10 分間遠心分離して得た透明上清各 1 ml について NO_2^- , NH_2OH 及び NH_4^+ を測定した。別に反応開始直後のものについても同様に測定し対照値を求めた。こうして得た反応液中の増減を第 16 表に示す。 NO_2^- 及び NH_2OH は何れも当研究室で常用しているグリース試薬を用いる山藤秋田法⁽²⁰⁾で測定し、又 NH_4^+-N はインドフェノール法⁽²¹⁾で求めた。

こうして之等の反応系で NH_4^+ の生成が認められたが、更に NO_3^- 区では NO_2^- 及び NH_2OH も検出された。又 NO_2^- 区の場合も同様に NH_2OH の生成も測定されたが、それと共に基質の減少も認められた。 N_2O_2 についてはその不安定性と特異的測定法が知られていないためにその検出は行わなかった。又山藤秋田法で NH_2OH と同様に発色するため N_2O_2 を基質とした場合、 NH_2OH の生成は測定出来なかったが NH_4^+ の生成は確かめられた。他方インドフェノール法によって NH_2OH も発色するため NH_2OH 区に於ける NH_4^+ の増加も測定する事は出来なかったが、基質の減少が起る事は明らかであった。先に述べたように本測定は定性の域を出ず酵素の精製及び Stoichiometry の検討を要する事は当然である。又各段階の反応が同一酵素によって行われるか否かも今後の研究に俟たなければならない。しかし之迄微生物で明らかにされてきた知見をも併せ考慮すれば、少くも NO_3^- から NH_4^+ に至る還元系の存在を支持するものと考えられる。

考 察

之等の結果は雞肝臓にも DPNH-FAD に共転する硝酸還元酵素系が存在する事を示唆している。然も従来認識されていた A 活性^(1,2,4,5)とは性質も全く異っている事は明らかであり、更に牛肝、家蚕組織、パン酵母等にも含まれている事が観察され⁽²²⁾、かなり分布の広いものと推定される。他方前報⁽⁸⁾でフラビンを加えた場合亜硝酸の減少が起る事を認め還元酵素によるものと推定した。しかし耐熱性、至適 pH 等の比較からここに検討した D 活性とは異なるものと思われる。微生物については菌種によって異なる数種の硝酸還元酵素の存在が知られているが⁽²³⁾、動物肝臓に於ても、然も同一組織に異った硝酸還元酵素が含まれている事が推定され、酵素の多様性は動物にも適用されると思われる。こうして動物組織の硝酸塩還元の本体として Dixon 氏等に主唱されて以来今日に及んでいるキサンチン乃至アルデヒド酸化酵素説は、少くとも一部を示しているに過ぎないと思われ、ここに認められた D 活性の研究は更に新しい知見をもたらすものと考えられる。特に興味あるのは動物に於ても硝酸からアンモニア迄の還元系がある事、並びに従来亜硝酸とヒドロキシルアミンとの中間段階については多くの論議があり、Medina 氏等⁽²⁴⁾が次亜硝酸である事を *Neurospora* について初めて示したが、肝臓に於ても同様に次亜硝酸を経由すると思われる。併し TPNH と反応し得ない点に於て *Neurospora*⁽¹⁰⁾ の硝酸還元酵素とは異っている事である。

こうして種々の動植物組織のオキシム含量の測定⁽²⁵⁾から発しバイラス発現機構と関連して⁽²⁶⁾その生成を追及するために開始した本研究も A 活性を主体としていたために亜硝酸の段階に止っていたが、D 活性の発見は同じ肝臓にアンモニア酸化系も存在する事を認めた最近の発見と共に無機窒素循環系の存在を推定するに至り^(22,27)、動物組織に於けるオキシム生成に関与する酵素系を明らかにする端緒が初めて得られたものと考えられる。

総 括

雞肝臓に硝酸塩による DPNH の酸化を触媒する酵素活性を認めた。本活性は FAD 及び燐酸塩を要するが、TPNH 及び FMN は無効であった。熱に対してかなり弱く反応の至適温度は 30° 、pH は 7.7 である。空気、 NaN_3 及びモノヨード醋酸では阻害されず、又凍結乾燥しても活性は保持された。之等の性質はアルデヒド酸化酵素と密接な関係を持つ硝酸還元酵素のものと全く異っている。更に硝酸からアンモニアに至る還元系も含まれる事が推定された。

本研究に使用した FMN を恵贈された名城大学農学部近藤弘氏に感謝申上げる。尚研究の要旨は 1959 年 4 月本会大会に於て発表した。

- (1) M. Dixon, S. Thurlow : *Biochem. J.*, 18, 989 (1924).
- (2) F. Bernheim, M. Dixon : *Biochem. J.*, 22, 125 (1928).
- (3) 大村浩久 : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22, 387 (1958).

- (4) 大村浩久, 高橋平八郎 : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 83 (1959).
- (5) 大村浩久 : 九大農学芸誌, 17, 205 (1959).
- (6) 大村浩久 : *Enzymologia*, 20, 271 (1959).
- (7) 大村浩久 : 本誌, 33, 652 (1959).
- (8) 大村浩久, 井田 明, 松口竜彦 : 九大農学

- 芸誌, 17, 233 (1959).
- (9) 谷口茂彦, 佐藤 了, 江上不二夫: *Inorganic Nitrogen Metabolism*, p. 87, (1956).
- (10) A. Nason: *Inorganic Nitrogen Metabolism*, p. 109, (1956).
- (11) 山藤一雄, 青木みか, 大村浩久: *Enzymologia*, 17, 371 (1956).
- (12) 山藤一雄, 箴島 豊, 大村浩久, 吉田 勤: *Enzymologia*, 21, 37 (1959).
- (13) 大村浩久: *J. Fac. Agr. Kyushu. Univ.*, 10, 365 (1956).
- (14) 赤堀四郎編: 酵素研究法, I, p. 673(1955).
- (15) 赤堀四郎編: 酵素研究法, I, p. 677(1955).
- (16) W. W. Westerfeld., D. A. Richert, E. S. Higgins: *Inorganic Nitrogen Metabolism*, p. 492 (1956).
- (17) 大村浩久: 九大農芸誌, 14, 423 (1954).
- (18) 山藤一雄, 箴島 豊, 大村浩久, 田中孝夫: *Enzymologia*, 21, 139 (1959).
- (19) D. J. D. Nicholas, J. H. Scawin: *Nature*, 178, 1474 (1956).
- (20) 山藤一雄, 秋田利彦: *Enzymologia*, 15, 313 (1952).
- (21) 八木国夫, 奥田 潤: 蛋白質 核酸 酵素, 4, 139 (1959).
- (22) 山藤一雄, 箴島 豊, 大村浩久, 波多野昌二: *Enzymologia*, 21, 245 (1960).
- (23) 谷口茂彦: 生物科学, 9, 99 (1957).
- (24) A. Medina, D. J. D. Nicholas: *Nature*, 179, 533 (1957).
- (25) 山藤一雄, 近藤 弘, 大村浩久: *Enzymologia*, 14, 153 (1950).
- (26) 山藤一雄, 大村浩久: 本誌, 23, 321(1950).
- (27) 山藤一雄, 箴島 豊, 大村浩久: *Nature*, 185, 165 (1960).

2-ビニルフランの γ 線重合*

三 品 岡 良**(大阪大学産業科学研究所)

昭和 35 年 1 月 22 日 受 理

緒 言

フルフラールの利用法は種々研究されているが, そのうち八浜ら⁽¹⁾はフルフラールからパーキン反応によって 2-フリルアクリル酸を合成し, 更にこれを脱炭酸することによって 2-ビニルフランを合成し, その単独重合およびスチレンとの共重合を行っている。又最近 Andreeva, Koton⁽²⁾ はチオフェン, ジベンゾビニルチオフェン, ジベンゾビニルフラン及び 2-ビニルフランの過酸化ベンゾイルを触媒とした重合に関する研究を報告している。著者⁽³⁻⁶⁾は炭水化物に対する γ 線の作用とその利用に関する研究を行い, 既にその一部を報告したが, ここにフルフラールから容易にえられる 2-ビニルフランの γ 線重合についてえられた結果を報告する。

実 験 方 法

2-ビニルフランの合成 八浜ら⁽¹⁾の方法に基づきフルフラールを原料とし 2-ビニルフランを合成した。但し 2-フリルアクリル酸の脱炭酸の触媒としては, 塩化銅の代りに塩基性炭酸銅を使って好成績を得た。2-ビニルフランは $d_4^{20}=0.9440$, $n_D^{20}=1.4995$, b. p.=99.5~100° の無色のスチレン様の臭気をもった液体で, 窒素置換を 5 回行った封管中で冷暗所に保存し, 照射反応を行う直前にこれを再蒸溜して使用した。

2-ビニルフランの γ 線重合 2-ビニルフラン約 5 g を精秤し封管に入れ真空中照射の場合は窒素で 5 回空気を置換して後に真空中に封じ, これに Co^{60} を線源として 4.2×10^4 r/hr の線量率で γ 線照射を行った。生成物はハイドロキノン少量を含むメタノール中に投入して沈殿, 乾燥した。重合率は生成したポリマーの重量の最初に使用したモノマーの重量に対する比で表した。

2-ビニルフランの触媒重合 触媒として市販品を 2 回再結晶を行って精製した $\alpha\alpha'$ アゾビスイソプロピロニトリル 0.5~2 g を加え 60~137.5° の各種条件で加熱重合させた。生成物は γ 線重合の場合と同様に処理した。

線量率の測定 Weiss⁽⁷⁾ の硫酸セリウム法で行い全線量はこれに照射時間に乗じて計算した値を示す。

極限粘度の測定 トルエンを溶媒として 25° でオストワルド型粘度計を用いて測定した。

膨潤容積比の測定⁽⁸⁾ 試料約 0.02 g を精秤し 70 メッシュの銅網で包み試験管中で 20° のトルエンで膨潤さ

* Polymerization of 2-Vinylfuran by the γ -Irradiation.

By Akira MISHINA (The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

** 当時大阪大学工学部応用化学教室