

煙草葉の Hydroxylamine Reductase と Catalase について

古賀克也・福永隆生・加納恭子

Studies on the Relationship between Hydroxylamine Reductase and Catalase Action in the Tobacco Leaves

Katsuya KOGA, Takao FUKUNAGA and Kyoko KANOU

(Laboratory of Animal Biochemistry)

緒 言

細菌において $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3$ という還元は WOOD¹⁾ により証明されているが高等植物についてはまだ完全には明らかにされていない。しかし CHIBNALL ら²⁾ は微生物で観察された反応と似た一連の還元反応が高等植物でも行われているだろうと述べ HATTORI³⁾ も藻類を用いた実験からこの見解を支持している。

EVANS & NASON⁴⁾ は始めて大豆葉から硝酸還元酵素を純化しており、また該酵素が広く高等植物の根や葉に分布していることを確かめ代謝の旺盛な組織程活性が高いことを見出している。FREAR ら⁵⁾ は大豆葉について hydroxylamine reductase の測定法を報告している。一方細菌による N 固定の中間体として hydroxylamine, oxime の存在が明らかにされているし、⁶⁾ 高等植物中にも微量の hydroxylamine, oxime が存在することが報告されている。⁷⁾ また hydroxylamine, oxime はウイルス病発現に関係をもっているらしいこと、⁸⁾ さらには hydroxylamine は種々の酵素 (牛の amine oxidase,⁹⁾ 菌類の arginine dihydrazase,¹⁰⁾ bacteria の transaminase,¹¹⁾ cytochrom C peroxidase,¹²⁾ catalase,¹³⁾ dopa decarboxylase,¹⁴⁾ glutamic decarboxylase,¹⁵⁾) に対し阻害作用をもつことが報告されている。これらのことから hydroxylamine の生体内での役割、変化をみのがすことは出来ない。しかるに植物における nitrite, hydroxylamine の還元酵素についてはわずかに FREAR⁵⁾ の大豆葉に関する研究並びに CRESSWELL¹⁶⁾ の西洋かぼちゃに関する研究をみる程度であり、煙草葉の hydroxylamine reductase に関する研究は著者の知る限りみられない。

ウイルス病に感染した組織の catalase 作用が低下することは広く認められている。山藤ら¹⁷⁾ は hydroxylamine を蚕に添食させて catalase 作用が低下することを報告している。かように N-代謝系の一部に関与する hydroxylamine reductase と呼吸系に関連をもつ catalase 作用との間には深い関係がある。著者らは FREAR ら⁵⁾ が大豆葉について行った hydroxylamine reductase 作用力の測定法を応用し、煙草の hydroxylamine reductase 作用力も測定可能なことを認めたので煙草の健全葉およびウイルス接種葉について reductase 作用の消長を調べ catalase 作用の消長と比較検討した。また hydroxylamine や nitrate による catalase 作用の阻害度についても調べ若干の知見をえた。

実験材料および方法

1. 実験材料

煙草は日本専売公社谷山煙草試験場より分譲をうけた苗 (品種 Bright yellow) を鉢植で生育させ草丈 40~60 cm, 着葉数 20~22 枚に生育したものを実験に供した。さらに同一条件で生育させたものにモザイクウイルスを 1962 年 4 月 3 日接種して約 1 カ月後明らかに発病したものをウイルス病葉

として供試した。

2. 実験方法

[I] Hydroxylamine reductase 作用力の測定法

FREARら⁵⁾の方法を検討して応用した。

i) 酵素液の調製 葉脈を除去した生葉 1gm を秤量し石英砂 1gm を加えて磨砕後、これに M/20 phosphate buffer 10 ml を加えて抽出し、遠心分離 (13,000 r.p.m. 10 分間) 後上澄液を酵素液とした。

ii) 測定法 $25 \times 10^{-8} \text{ mol/ml}$ hydroxylamine 溶液 1ml を基質とし、M/20 phosphate buffer 1ml, $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ DPNH* 0.1 ml, M/1000 MnCl_2 0.1 ml, 酵素液 0.3 ml を加えて15分間 30°C で反応させる。その後 12% trichloroacetic acid 0.2 ml を加えて反応を停止させ、1% 8-quinolinol in EtOH 溶液 1 ml と 1 M Na_2CO_3 1 ml を加えて1分間沸騰水中に置き発色させる。さらに遠心分離 (5,400 r.p.m. 5 分間) を行い、hydroxylamine の量を日立製 EPU-2A 型光電分光光度計を用い $705 \text{ m}\mu$ で比色定量する。別に酵素液を沸騰水中で失活させたものを使用し同一操作で平行実験を行い、その差より hydroxylamine の分解量を求める。酵素作用力は酵素液 1ml 当りの hydroxylamine 分解量で示した。

iii) Hydroxylamine 検量曲線 上記の方法に従って検量曲線を求めた所、アルカリ側で hydroxylamine が不安定なため再現性に乏しいので trichloroacetic acid を添加後 buffer を加えて発色を行い検量曲線を求めた。その結果 1 図の如く濃度 $25 \times 10^{-8} \text{ mol/ml}$ 以下では LAMBERT-BEER の法則に従うことを認めた。その関係式は次の通りである。

$$y = \frac{x}{32} \quad x; \text{hydroxylamine の濃度 (単位; } 10^{-8} \text{ mol/ml)} \quad y; \text{optical density}$$

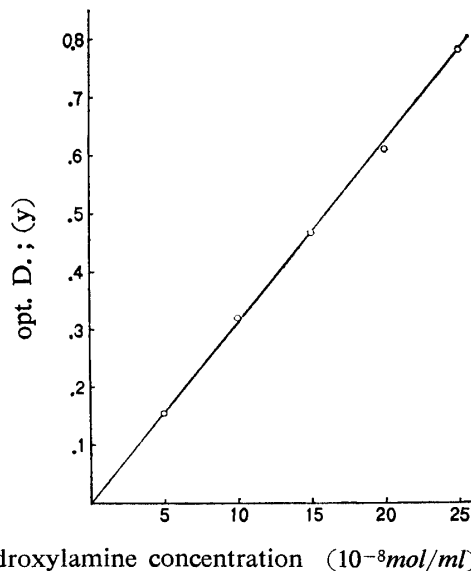


Fig. 1 Standard line for the determination of hydroxylamine
Hitachi EPU-2A spectrophotometer ($705 \text{ m}\mu$) was used.

* DPNH; Diphosphopyridine nucleotide (Reduced form)

[II] Catalase 作用力の測定法

i) 酵素液の調製 葉脈を除去した生葉 2gm に石英砂 2gm を加え磨碎する。これに M/15 phosphate buffer (pH; 6.88) 25ml を加えて 23°~25°C の浴中にて2時間抽出を行う。さらに遠心分離 (3,000 r.p.m. 40分間) を行い上澄液を2倍に稀釈して酵素液として使用した。

ii) 酵素力測定 測定方法は SUMNER-SOMERS によるヨード法¹⁸⁾¹⁹⁾ に従い 0, 2, 4, 6, 8, 10 分の各時間における基質の分解量を求め、一次反応とみなして各時間の速度恒数 k の値を次式により求めた。

$$k = \frac{1}{0.4343 t} \times \log \frac{a}{a-x} \quad \begin{array}{l} a; \text{hydrogen peroxide の初量} \quad x; \text{hydrogen peroxide の反応量} \\ t; \text{反応時間 (min)} \end{array}$$

t を横軸に k を縦軸にとり各時間に於ける k をプロットし t→0 の外挿値 k を求めて酵素力とした。

実験結果および考察

1. Hydroxylamine reductase 作用について

i) PH および温度の検討 先ず反応条件を検討するため作用力に対する pH および温度の影響を調べた。その結果を第 I, 第 II 表に示した。pH の検討は先ず 7.0, 8.0, 9.0 次いで 8.3, 8.6, 9.0

Table I. The relation between PH and the relative activity of hydroxylamine reductase

i)			
PH	7.0	8.0	9.0*
·10 ⁻⁸ mol NH ₂ OH/Enz. soln. 1 ml	34.0	49.0	43.0
buffer solution ; M/20 NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ HPO ₄ *NaH ₂ PO ₄ -Na ₂ B ₄ O ₇			
ii)			
PH	8.3	8.6	9.0
·10 ⁻⁸ mol NH ₂ OH/Enz. soln. 1 ml	10.0	24.3	22.0
M/20 NaH ₂ PO ₄ -Na ₃ PO ₄			

Table II. The relation between reactive temperature and the activity of hydroxylamine reductase

Temperature (°C)	25	30	35
·10 ⁻⁸ mol NH ₂ OH/Enz. soln. 1 ml	34.0	54.7	50.9

で行った結果 pH 8.6 附近に至適 pH があることを認めた。FREARら⁵⁾ が大豆葉の該酵素力測定について用いた至適 pH は 6.8 であり、著者らが行った結果では桑葉で pH 7.6,²⁰⁾ 甘蔗葉で pH 9.0²¹⁾ 附近であることから植物によって至適 pH は異なるものと考えられる。

作用温度は 30°C 附近が作用力は最も大きく FREAR ら⁵⁾ の成績と同様であった。従って以後の実

験では pH 8.6, 温度 $30^{\circ}C$ を採用した.

ii) 経時変化 hydroxylamine reductase 作用力が朝から夕刻へかけていかなる経時変化をするかと云うことは生体内における hydroxylamine やその還元物質の役割, 他酵素とのバランスを考慮するさい重要な意味があると思われる. catalase についてはすでに中井ら²²⁾の報告がある. 経時変化は2図に示すごとく雨天時室内に放置したものと晴天時室外に放置したものについて行ったものである. 前者は一日中を通して弱く, その経時変化は特別の傾向を示さない. それに反して後者は明らかに日中特に 12~13 時頃が強い. この事実は煙草葉の hydroxylamine reductase 作用は日照 (光) により影響されることを明示している. 藻類の hydroxylamine の還元作用も電灯光の光量増加により増大すると云われる.³⁾ この結果は中井ら²²⁾ が得た煙草の catalase 作用の経時変化と同様の傾向である. すなわち両酵素とも代謝の盛んな日中に強く両者は正の相関関係をもっている.

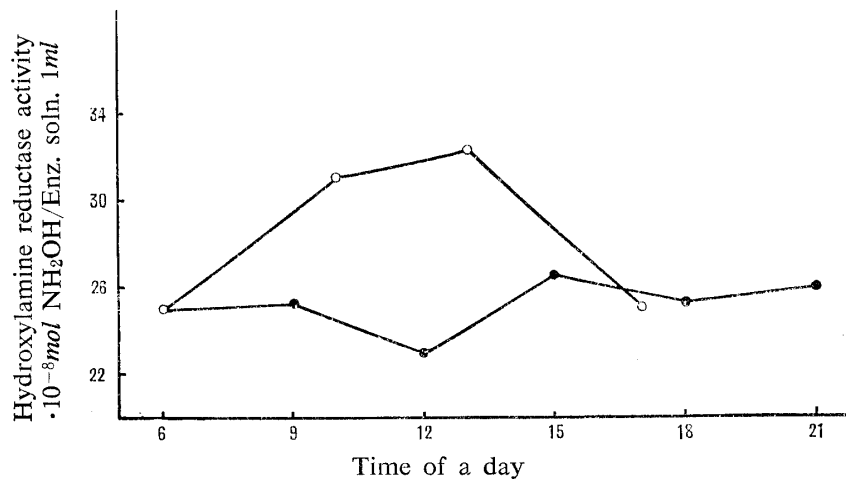


Fig. 2 Hydroxylamine reductase activity during a day

●—●— rainy day (indoor) ○—○— fine day (outdoor)

iii) 葉位別変化 reductase 作用力の葉位別変化については第 III 表に示すごとく下位葉になる程弱く, 5, 6 葉が特に強い傾向を有しているようである.

Table III. Hydroxylamine reductase activity in the tobacco leaves

Position order	3rd, 4th	7th	15th	16th
$\cdot 10^{-8} \text{mol NH}_2\text{OH/Enz. soln. 1 ml}$	25.6	25.6	22.0	12.3
Position order	5th, 6th	9th		
$\cdot 10^{-8} \text{mol NH}_2\text{OH/Enz. soln. 1 ml}$	35.0	25.3		

Position order was counted from the top leaf.

iv) 健全葉と病葉の比較 健全葉とウイルス罹病葉を比較してみると第 IV 表の通りで全葉位を通じて健全葉が病葉に比し作用力は強い傾向を示している.

2. Catalase 作用について

健全葉とウイルス罹病葉の catalase 作用力を葉位別に測定した結果を第 V 表および第 VI-(1) 表

Table IV. Comparison of the hydroxylamine reductase activities in healthy and virus-diseased tobacco leaves

Position order	3rd, 4th	6th	7th	12th	15th	16th
Healthy leaf	25.3	27.6	25.3	29.3	21.0	12.7
Virus-diseased leaf	29.3	24.0	21.3	22.6	20.0	13.7
Determined time	A.M.9.00	A.M.11.00	P.M.5.00	P.M.3.00	A.M.9.00	P.M.3.00
Mosaic appearance	+	+	+	+	-	-

activity; $\cdot 10^{-8}$ mol $\text{NH}_2\text{OH}/\text{Enz. soln. 1 ml}$

Table V. Comparison of relative activities of catalase in healthy and virus-diseased tobacco leaves

Position order	2nd, 3rd	6th, 7th	10th	11th	12th
Healthy leaf	18.5	30.5	18.9	18.3	12.0
Virus-diseased leaf	10.6	20.1	18.1	13.0	11.4

Silica sand 2 gm was added to 2 gm of fresh leaves, grinded and extracted with 25 ml of M/15 phosphate buffer ($pH=6.88$) and centrifuged, then the supernatant diluted 2 times.

That was used as crude enzyme solution.

Relative activities were represented as $(k)_{t \rightarrow 0} \cdot 10^2$ according to SUMNER-SOMERS method.

Determination of catalase action was taken place during May, 1962 and the room temperature (20°C) was used for the reaction.

に示した. catalase 作用力も hydroxylamine reductase 作用力と同様に 6, 7 葉が強く順次, 下葉位になるに従い弱くなり, また罹病葉は健全葉に比して明らかに弱い.

なお抽出酵素液中の窒素並びに粗蛋白質量を第 VI-(2) 表に示した. この表から窒素並びに粗蛋白質

Table VI-(1). Comparison of relative activities of catalase in healthy and virus-diseased tobacco leaves

Position order	3rd	5th, 6th	10th, 11th	14th
Healthy leaf	0.56	3.40	1.90	0.66
Virus-diseased leaf	0.33	2.14	1.50	0.30

Determination of catalase action was taken place during July, 1963 and the room temperature (32°C) was used for the reaction.

Table VI-(2). Contents of nitrogen and protein in the enzyme solution (50 ml)

	Position order	5th, 6th	10th, 11th	15th, 16th
Nitrogen	Healthy leaf	10.27 mg	9.81 mg	6.69 mg
	Virus-diseased leaf	12.96 "	11.68 "	9.11 "
Crude Protein	Healthy leaf	64.19 mg	61.31 mg	41.81 mg
	Virus-diseased leaf	81.00 "	73.00 "	56.94 "

Silica sand 4 gm was added to 4 gm of fresh leaves, grinded and extracted with 50ml of M/15 phosphate buffer ($pH=6.88$).

質含量はいつでも病葉が健葉より大であることが認められる。従って前述両酵素作用力の健病両葉における差異は酵素液中の窒素あるいは蛋白質当りに換算してもさらに大きくなる。

以上の事から catalase 作用力と hydroxylamine reductase 作用力とは常に正の相関関係にあることが窺知された。蚕に hydroxylamine を添食させて catalase 作用を低下させることに成功している山藤の報告¹⁷⁾を著者らの実験結果と考え合せると代謝の旺盛な葉において hydroxylamine reductase の作用力が正常レベルより低下すれば hydroxylamine の集積が起り catalase 作用を低下させることが考えられる。すなわちバイラス病体の catalase 作用の低下には hydroxylamine reductase 作用力の低下も促進効果をもっていると推定できる。

3. Catalase 作用に対する hydroxylamine 並びに nitrate の阻害

秋田²³⁾は hydroxylamine, acetoxime の酵母 catalase 作用に対する阻害度を調べて hydroxylamine の阻害が大きいことを報告している。著者も hydroxylamine の煙草の catalase 作用に対する阻害状態を *in vitro* で調べた。さらに CHIBNALL²⁾によって提出されている $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{N}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3$ の一連の反応を参照し nitrate の影響についても調べた。

i) Hydroxylamine の阻害 先ず catalase 作用測定時、基質溶液に $10^{-7} \sim 10^{-3} \text{ mol/l}$ hydroxylamine 溶液をそれぞれ 0.1 ml 加え、その後酵素液を加えて反応させて作用力 k を求めた。その結果は第 VII 表に示した。

Table VII. Inhibition effect of hydroxylamine on the catalase action when hydroxylamine was added to the substrate solution

Added NH_2OH soln.	Final conc. of NH_2OH (mol/l)	$k \cdot 10^2$	inhibition degree (%)	note
0 mol/l, 0.1 ml	0	24.20	0*	*addition of H_2O instead of NH_2OH soln.
10^{-7} //, 0.1 ml	1.4×10^{-9}	24.15	0.21	
10^{-6} //, 0.1 ml	1.4×10^{-8}	23.10	4.55	
10^{-5} //, 0.1 ml	1.4×10^{-7}	18.00	25.62	
10^{-4} //, 0.1 ml	1.4×10^{-6}	9.30	61.57	
10^{-3} //, 0.1 ml	1.4×10^{-5}	2.55	89.46	

次に buffer-hydroxylamine 溶液で抽出を行った場合の catalase 作用力を測定した。すなわち生葉 2 gm に石英砂 2 gm を混じて磨碎し M/15 phosphate buffer 20 ml, hydroxylamine 5 ml を加えて $23 \sim 25^\circ\text{C}$ で抽出した。その結果は第 VIII 表の通りである。catalase 作用測定時に hydroxylamine を加えると終末濃度 $1.4 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ 程度で阻害が現われ始め $1.4 \times 10^{-7} \text{ mol/l}$ 程度で約 26% も阻害する。hydroxylamine を含む buffer で抽出を行うと $7.1 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ で約 26% の阻害となり、前者に比して約 500 倍の濃度差がある。catalase 抽出時に添加された hydroxylamine は抽出中に reductase により分解され、測定時には hydroxylamine 濃度は低下するものと推定できる。この結

Table VIII. Inhibition effect of hydroxylamine on the catalase action, especially when buffer-hydroxylamine mixture was used for extracting

Added NH_2OH soln.	Final conc. of NH_2OH (mol/l)	$k \cdot 10^2$	inhibition degree (%)	note
0 mol/l, 5 ml	0	10.05	0*	*addition of H_2O instead of NH_2OH soln.
10^{-3} //, 5 ml	1.4×10^{-5}	7.72	23.18	
5×10^{-3} //, 5 ml	7.1×10^{-5}	7.47	25.67	
10^{-2} //, 5 ml	1.4×10^{-4}	5.52	45.07	
10^{-1} //, 5 ml	1.4×10^{-3}	0	100	

果から hydroxylamine は catalase 活性基と coupling して catalase を不活性にするのではなく, catalase-hydrogen peroxide 間の結合を阻害するものと推察される。

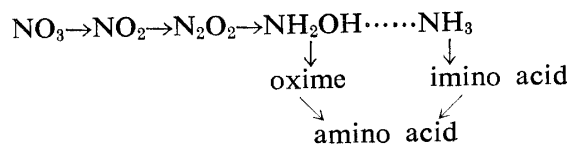
ii) **Nitrate の阻害** catalase 作用測定時基質溶液に $10^{-3} \sim 10^{-1} \text{ mol/l}$ の sodium nitrate 溶液を 0.1 ml 添加して反応させ k を求めた。その結果を第 IX 表に示した。hydroxylamine の阻害度に比較

Table IX. Inhibition effect of nitrate on the catalase action when nitrate was added to the substrate solution

Added NaNO ₃ soln.	Final conc. of NH₂OH NaNO ₃ (mol/l)	k · 10 ²	inhibition degree (%)	note
0 mol/l, 0.1 ml	0	13.50	0*	*addition of H ₂ O instead of NH₂OH soln. NaNO₃
10 ⁻³ //, 0.1 ml	1.4 × 10 ⁻⁵	13.50	0	
10 ⁻² //, 0.1 ml	1.4 × 10 ⁻⁴	11.10	17.78	
10 ⁻¹ //, 0.1 ml	1.4 × 10 ⁻³	8.95	33.70	

すれば nitrate の阻害度は著しく小さい。例えば hydroxylamine は $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 濃度で阻害度約 89 % であるのに対し, nitrate は $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ 濃度では阻害効果は認められず $1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ 濃度でわずか約 18 % の阻害度を示すのみである。植物が正常であれば nitrate は還元されて nitrite, hydroxylamine その他の中間物質に変化する。従って nitrate 添加による阻害の発現は nitrate 自体によるよりもむしろその還元中間物質によるのではないかと考えられる。nitrate の終末濃度 $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ では阻害効果が全くみられないがこれは nitrate から生じた hydroxylamine が hydroxylamine reductase で還元されるので hydroxylamine 濃度が catalase 作用の阻害濃度までに上昇しないか、あるいは上昇しても一時的なもので迅速に分解が行われるためと考察される。

DELWICH ら²⁴⁾ は煙草において葉に与えた N¹⁵H₄ (radio isotope を含むアンモニア) が N¹⁵O₃ に移行しないことを証明しており、つまり植物が正常な状態の場合硝酸の還元は可逆的ではないものと推察している。十分に窒素肥料を与えた生育の良好な正常状態の植物では WOOD ら¹⁾ が菌類について提出している一連の反応に似た還元がおり hydroxylamine は生体内にはほとんど蓄積されないう一部は ammonia, 一部は oxime を



経てアミノ酸に移行してゆく²⁵⁾ と考えられる。著者²¹⁾ が甘蔗の茎部について hydroxylamine reductase 作用力を測定した結果によれば糖の多い部分は hydroxylamine reductase 作用力が弱く、さらに amino acid, amide 量の近似値を示す青色値は小さく、糖の少ない部分すなわち茎部先端に近づくにつれて逆に hydroxylamine reductase 作用力は強く青色値は大であった。このことも植物体の reductase と amino acid 等とが密接な関係にあることを指摘している。

本研究で認められた hydroxylamine reductase と catalase の作用が葉位別並びに健病両者においても類似の傾向を示すこと、さらに hydroxylamine が catalase 作用を阻害することなどの結果から何らかの原因によって hydroxylamine reductase 作用が抑制されるかあるいは弱くなれば当然 hydroxylamine が蓄積されることが推定される。これが一時的なものであれば徐々に分解されて再び正常状態にかえり得るだろう。しかし hydroxylamine reductase の作用力の低下が長く続く場合は catalase 作用は阻害されることになる。山藤¹⁷⁾²⁶⁾²⁷⁾ のバイラス発現に対する過酸化水素の触媒効果

を考慮すれば植物体（煙草）においても hydroxylamine reductase 作用力の急激な低下は間接的にウイルス発現に促進的役割を示すものと推察される。もちろん高等植物においても hydroxylamine は amine oxidase, transaminase, dihydrase, cytochrom C peroxidase, decarboxylase 等の作用にも影響をおよぼすことも考えられるが、これらの酵素作用力の低下によるその基質の増加をウイルス発現に関連させることの論拠は目下のところ考えられない。

要 約

煙草葉における hydroxylamine reductase 作用力は FREAR and BURRELL の方法で測定出来ることを認めたのでその 2, 3 の性質と消長を調べ catalase 作用の消長と比較検討し次の結果を得た。

1) Hydroxylamine reductase 作用の至適 pH 域は 8.6 附近であり大豆葉 6.8, 桑葉 7.6, 甘蔗葉 9.0 とは異なる。

2) Hydroxylamine reductase 作用力の朝から夕方へかけての経時変化をみれば日照の多い 12~13 時が最も強い。雨天時にはその変化はほとんど認められない。

3) Hydroxylamine reductase および catalase の作用力は葉位別にみれば共に 5, 6 葉が最も強く、下位葉になる程弱くなる。また健全葉とウイルス罹病葉における両酵素の作用力は共に後者が弱い。

粗酵素抽出液中の窒素並びに粗蛋白質量は病葉が健全葉よりも大である。

4) Catalase 作用に対する hydroxylamine と nitrate の阻害度は前者が著しく大であり、 $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ で阻害度約 89% であるのに対し、後者は $1.4 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ では阻害効果はみられず $1.4 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ でわずかに約 18% の阻害度を示すのみである。

本報告の一部は昭和37年11月17日日本農芸化学会西日本支部大会（第88回）で講演したものである。

引 用 文 献

- 1) WOOD, D. D. : *Biochem. J.*, **32**, 2000~2012 (1938)
- 2) CHIBNALL, A. C. : *Protein Metabolism in the Plant*, (1939) Yale University Press, New Haven 生化学 (下) 江上不二夫外4名訳書, 499頁より引用 (1956) 丸善
- 3) HATTORI, A. : *Plant and Cell Physiol. (Japan)*, **3**, 355~369 (1962)
- 4) EVANS, H. J. and A. NASON : *Plant physiol.*, **28**, 233~254 (1953)
- 5) FREAR, D. S. and R. C. BURRELL : *Anal. Chem.*, **27**, 1664~1665 (1955)
- 6) VIRTANEN, A. I. and T. LAINE : *Biochem. J.*, **33**, 412~427 (1939)
- 7) YAMAFUJI, K., H. KONDO and H. OMURA : *Enzymologia*, **14**, 153~156 (1950)
- 8) YAMAFUJI, K., T. AKITA and M. INAOKA : *ibid.*, **14**, 164~169 (1950)
- 9) TABOR, C. W., H. TABOR and S. M. ROSENTHAL : *J. Biol. Chem.*, **208**, 645~660 (1954)
- 10) OGINSKY, E. L. and R. F. GEHRIG : *ibid.*, **198**, 799~805 (1952)
- 11) COLOWICK, S. P. and N. O. KAPLAN : *Methods in Enzymology*, **2**, 177~177 (1955)
- 12) *idem* : *ibid.*, **2**, 763~764 (1955)
- 13) 赤堀四郎編：酵素研究法, **2**, 327~332 (1963) 朝倉書店
- 14) SCHALES, O. and S. S. SCHALES : *Archiv. Biochem.*, **24**, 83~91 (1949)
- 15) *idem* : *ibid.*, **11**, 155~166 (1946)
- 16) CRESSWELL, C. F., R. H. HAGEMAN and E. J. HEWITT : *Biochem. J.*, **83**, 38p~39p (1962)
- 17) 山藤一雄：農学, **3**, 694~698 (1949)
- 18) SUMNER, J. B. and G. F. SOMERS : *Chemistry and Methods of Enzymes*, New York, p25 (1943)
- 19) 奥田東編：植物栄養生理実験書, 249~251 (1953) 朝倉書店
- 20) 古賀克也・福永隆生：日本蚕糸学会九州支部会講演要旨, 10 (1963)

- 21) 著者：未発表
- 22) 中井武文・稲葉泰：日農化誌, **24**, 105~110 (1951)
- 23) 秋田利彦：*ibid.*, **24**, 391~392 (1951)
- 24) DELWICH, C. C. : *J. Biol. Chem.*, **189**, 167~175 (1951)
- 25) YAMAFUJI, K., Y. OSAJIMA and H. OMURA : *Nature*, **185**, 162~162 (1960)
- 26) 山藤一雄・吉原典・稲岡憲：植物ウイルス病研究報告, 20~24 (1950) 養賢堂
- 27) YAMAFUJI, K. : *Nutritional Factors in Virus Formation*, 70~76 (1964) Crosby Lockwood & Son Ltd. (London)

Summary

FREAR and BURRELL method was recognized by the authors to be useful in the determination of the hydroxylamine reductase activity in the tobacco leaves. The relationship between the hydroxylamine reductase and the catalase action was studied in the present report.

The results were summarized as follows;

(1) The *pH* optimum of hydroxylamine reductase in the tobacco leaves was ascertained to be about 8.6, which differs from that in the mulberry (7.6), the soybean (6.8) and the sugar cane leaves (9.0).

(2) The strongest hydroxylamine reductase action was observed to lie at the period from noon to 1 p. m., the time when the metabolism in plant body increases, exceedingly. The tendency of variance was fixed to be the same as that of the catalase action reported by NAKAI et al. (1951). In a rainy day, the change of the hydroxylamine reductase action occurring with the lapse of time was scarcely noticed.

(3) Some significant direct proportional relations were confirmed between the hydroxylamine reductase and the catalase action in the tobacco leaves.

Through the whole leaves it was at the fifth and sixth leaves counting from the top-leaf that the above mentioned two enzyme activities were strongest, and the activities in the virus diseased leaves were always weaker than those in the healthy ones.

As to the nitrogen or protein content in the extracted crude enzyme solution, the virus diseased leaves showed more of it than the healthy ones.

(4) It was found that the inhibition-degree of hydroxylamine on the catalase action is far higher than that of nitrate. About 89 percentage of the catalase action was inhibited by hydroxylamine of 1.4×10^{-5} mol/l; while, none in case of nitrate of 1.4×10^{-5} mol/l and about 18 percentage, in case of 1.4×10^{-4} mol/l.