諸種蛋白質の呈色

蛋白質	加熱後の色	アルコール添加による色
卵アルブミン	赤	青
血液アルブミン	赤	青
ヘモグロビン	赤	青 紫
牛肉蛋白質	赤	紫 緑
サンマ肉蛋白	赤	帯緑 青
鮭肉蛋白質	赤	青
鰯肉蛋白質	赤	青
鯨肉蛋白質	赤	緑 青 褐
カゼイン	赤 褐	紫 青
ゼラチン	赤	青
ペプトン	赤	青
大豆全蛋白	赤 褐	青 緑
大豆グリニン	赤 褐	青 緑
小麦グリアヂン	赤	青 緑
エデスチン	赤	青
レグミン	赤 褐	緑 褐

上表の如く蛋白質は青系統の色調を呈するが、個々の蛋白に於ける色調の差違は構成アミノ酸の種類と量の差違に歸すべきものと考へられる。之に關しては後報に譲る事とする。

尙諸種の蛋白質を含有する物質に直接本反應を應用した時の呈色狀況は次表に示す如し。

物質	加熱後の色	アルコール添加による色
熱凝固卵白	赤	青
毛髪	暗赤	青
羊毛	暗赤	青
絹	暗赤	青
酵母	赤	赤 紫
餾粕	赤	青
南瓜種子脱脂粉末	暗赤	暗 青
玉蜀黍粉末	赤	青
大豆脱脂粉末	赤	青 緑
フスマ	暗赤	暗 青

要約

蛋白質は濃磷酸中で Diphenylamin と共に加熱熔融せしめると尿酸と同様青色色素を生成するが、その構造は夫々異なるものと考へられる。本呈色反應は蛋白質の一新呈色反應としてその定性に應用し得る事を述べた。終りに臨み御懇篤なる御指導を賜はつた大島康義教授に深甚の謝意を表するものである。

(九大・農部學) (九大・醫學部)

アノイリナーゼの研究* (第4報)

Studies on the Aneurinase, Report IV.

山崎 健子
K. YAMAZAKI

アノイリナーゼの作用機構についてはビタミン B₁ を分解してチオクローム反應が消失するとともにチアゾ反應も消失することがらその分解部位はピクミチン部とチアゾール部との結合點にあるべきことが推定されたが、まだ確認を得るに至らなかつた。(藤田、沼田¹⁾、しかるにその後シジミの實驗においてチオクローム反應が消失してもチアゾ反應が残存することが見られ、チアゾ反應がチアゾールの N が第 4 級のものにのみ陽性である事實からアノイリナーゼの作用は、ピリミチン部のアミノ基脱であるとの説があらはれた(村田²⁾)。著者はこの實驗を追試してシジミの場合はかゝる事實のあることを確めたが、ハマグリやアサリの場合にはチアゾ反應とチオクローム反應とは同時に消失することを確認して、前報の事實に間違のないことを確めた。即ち貝類アノイリナーゼには作用機構を異にする二種類の存在することを認め

ざるを得なくなつた。そこでアノイリナーゼの作用機構を他の方向から検討するためにピリミチン部とチアゾール部とより B₁ を合成することの出来る酵母を、アノイリナーゼによつて B₁ の分解されたものに作用させて見て果して B₁ が合成されるか否かを實驗して見たところ明かに合成されることを認め、しかもこの場合シジミを用いてもハマグリやアサリを用いても全く同様の關係を示した。シジミの場合の分解機構がハマグリやアサリと違ふものであれば、多少とも違つた關係を示すべきを豫想したのであつたが、この點では何等の違ひが認められなかつた。

實驗

(1) アノイリナーゼによる B₁ 分解率と B₁ 添加量との關係

ハマグリ(殻つき 62 g)の内容物を磨碎し Hcl を加へ

て PH 4.5 とし水を加へて 10 倍容とする、これを 30° の水浴中に入れて 15 分間時々振つて浸出し、冷却して PH 5.5 とし、遠心沈澱して上清を 10 cc づつとる。之に B₁ の種々量を加へ、トルオールを添加し、60°, 1 時間放置後 チオクローム法により B₁ を測定した。その結果は表 1 に示す。

表 1

B ₁ 添加量 (r)	B ₁ 残存量 (r)	B ₁ 分解量 (r)	分解率 (%)
50	0	50	100
100	0.08	99.9	99.9
200	50*	150	75
400	200*	200	50

表中*のあるものはチオクローム蛍光が強く、通常の方式の如く行つては測定に不便であるので、ブタノールに移行せしめたチオクローム液をビュレットにとり、他方 1 r/cc の B₁ に相當する標準 チオクローム (ブタノール溶液) 液 5.0 cc を蛍光試験管にとり、この蛍光に等しくなるまで可検チオクローム液を滴下して測定した。例へば滴定値が 0.45 cc であれば、之が 5 r の B₁ に等しい譯であるから可検液 6 cc 中の B₁ 量は

$$\frac{5}{0.45} \times 6 = 66.5 \text{ r}$$

である。

この結果から明なることは B₁ 添加量が大なるほど B₁ の分解量は多となるが分解率は少となることである。この関係はアスコルビン酸酸化酵素において見られた處と全く同様である (藤田、川島³⁾)、即ち加へる B₁ を倍數稀釋として上述の條件下において 98% 以上を分解するときの B₁ 分解量をもつて酵素の強さをあらはすことが出来る (チオクローム反應の消失した時 B₁ のエステル型が出来るのでないことは、別の實驗でタカヂアスターゼを作用させてもチオクローム反應がいささかも現はれてこないことで確められた)。

(2) ハマグリ、アサリ、シジミのアノイリナーゼの強さの比較

上にのべた方式により三種の貝のアノイリナーゼの強

*1) 本論文の要旨は昭和 22 年 4 月 5 日大阪における日本醫學會第 4 分科會及び同年 4 月 16 日のビタミン B₁ 研究特別委員會にのべた。本研究は文部省學術研究會議の援助による (藤田)。

*2) 前 3 者は東京農業大學住江教授、後 2 者は東京大學農學部坂口教授より分與された。ここに厚く感謝の意を表する。

*3) 主としてコカルボシラーゼと考へられる。

さを比較した結果は表に示すとくである。この場合の實驗結果中丁度 98% 以上の分解率を示すものがなかつたものは添加量と分解率との關係を示す曲線をつくり、外挿法によつて 98% の値を求めた。

表 2

種 類	目 方 殻つき (g)	酵素の強さ
ハマグリ	62	100
	8.5	50
	8	99.6
	4	49
アサリ	12	49
	12	40
	11	15
	8.5	20
シジミ	3	3
	2.3	47
	2.3	10

これによると酵素の強さは個體差が非常に著しいが概してハマグリが最も強く、アサリは之に次ぎシジミは最も弱い、しかも大きいものほど酵素力が強いやうである。

(3) 合成培地の調製

酵母培養用の合成培地には次の組成のものを用いた。

蔗糖 (又は葡萄糖) 70g, NH₄ H₂ PO₄ 2g, KH₂ PO₄ 2g, MgSO₄ · 7H₂O 1g, CaCl₂ 0.5g, NaCl 0.5g、之に水を加へて 1 l とする。PH は 4.5 である。NH₄ H₂ PO₄ は既成品がなかつたので H₃ PO₄ を適當にアンモニアで中和して之に一致する組成のものをつくつた。合成培地を滅菌試験管に分注し煮沸水浴中に 15 分間加熱し、24 時間後に同様の加熱を反復した。

(4) 酵母による合成 B₁ の菌體及び培地中の分布

ビール酵母を麥芽エキスイ寒天培養基に 28°, 72 時間培養し、菌苔をかきとり、之を上述の合成培地 20cc に浮遊せしめる。このうち 2 cc をとつてヘマトクリットにより容積を測定し、5.0 cc は合成培地 5.0 cc に各 6 mg% ビリミヂン (以下 P と略) 液及びチアゾール (以下 Th と略記) 液 0.5 cc づつを加へ滅菌したものに加へ、他の 5.0 cc は合成培地 6.0 cc に加へて培養する。両者は 28°, 24 時間培養の後 2.0 cc をとつて菌の容積を測定、残りを遠心沈澱して上清と沈澱とに分ち何れも全容を 2.0 cc としてそのうち 5.0 cc について B₁ 量を測定し全量を求めた。その結果は上清中の B₁ 量 0.84 r (P, Th を加へないものは 0.24 r)、沈澱中の B₁ 量 12.2 r (P, Th を加へないもの 1.02 r) であつて合成 B₁ 中の 95% は菌體内に存在し培地中には殆どない

ことを知った。

実験に用いた P は 2-Methyl-2-oxymethyl-6-amino-pyrimidin (I) であり, Th は 4-Methyl-5 β -oxy α thyl thia ol (II) の鹽酸鹽である。

(5) 酵母各菌株による B₁ の合成

P 量 0.1 μ M, Th 量 0.1 μ M を用い, 酵母の各菌株の 22.5 cmm づつを用いて (4) と同様の条件により実験した。用いた酵母*は協會 2 號, Sake 2 號, Sake 6 號, SH III 3 號, Br H III 5 號の 5 種である。その結果 Sake 6 號の B₁ 合成量は最も少く 12.2 r であったが, その他は大體同様で合成量 21—23 r であった。そこでその後は主としてビール酵母 Br H III を用いることとした。

(6) 酵母による B₁ 合成量と菌量との関係

P, Th 各 0.5 μ M を用いて行つた結果を表 3 に示す。この場合遊離型のみを測定した。

表 3

添加 P 量; 69.5 r (0.5 μ M), Th 量; 89.88 r (0.5 μ M).
理論 B₁ 合成量; 168.1 r (0.5 μ M).
菌量; 8.92 cmm/cc.
P, Th 不添加の場合の B₁ 合成量: 0.01 r.
28 $^{\circ}$, 24 時間

菌液量 (cc)	菌 量 (cmm)	合成量 (r)	合成率 (%)	菌量 1 cmm に換算
0.5	4.46	2.99	1.78	0.67
1.0	8.92	7.09	4.20	0.79
2.0	17.84	12.89	7.65	0.72
4.0	35.68	16.59	9.90	0.46
8.0	71.36	45.59	27.30	0.64

之によつて見ると P 及び Th が十分量あるときは B₁ 合成量は菌量にほぼ比例することが見られる。同様にして P 及び Th を 0.05 μ M 用いた場合は合成率を増したが, 菌量を増しても遊離型 B₁ の合成率は約 74% 以上にはならなかつた。

(7) P 及び Th 添加量と B₁ 合成量との関係

菌量を一定とし加へる P 及び Th 量を變化する時の遊離型 B₁ 合成量をしらべた成績は表 4 に示す如くである。

之によると P 及び Th の添加量にはほぼ比例して B₁ 合成量が増加した。

表 4

菌量; 4 cmm, 28 $^{\circ}$ —29 $^{\circ}$, 24 時間
P, Th 不添加の場合の B₁ 合成量: 0.01 r

P 及び Th 添加量 (μ M)	B ₁ 合成量 (r)	B ₁ 合成量 理論値 (r)	合成率 (%)
0.0125	1.86	4.2	44.2
0.025	3.73	8.4	44.5
0.05	8.74	16.8	52.0
0.10	13.79	33.6	71.0
0.20	48.69	67.1	72.5

(8) 酵母による P 及び Th の B₁ 及びそのエステルへの合成

以上の実験は何れも B₁ の遊離型の合成をしらべたのであるが, 更にエステル型をも測定して見た。即ち酵母菌固形培養 1 白金耳を液體合成培地に 72 時間培養の後その上清をすて, 合成培地 10 cc を加へ (PH 4.5) 菌浮游液をつくる。他方合成培地 10 cc に P 及び Th 液各 0. cc (その中に 0.5 μ M を含有) を加へ 100 $^{\circ}$, 20 分煮沸滅菌し, 冷却後酵母菌浮游液 2 cc (菌量 17.3 cmm) を加へ (總容積 13 cc), 之を 27 $^{\circ}$, 20 時間培養した後 1 部をとり遊離型を測定し, 残りにはタカヂアスターゼ (1:100) 1 cc を加へ 37 $^{\circ}$, 1 夜放置の後 B₁ 量を測定した。その成績は表 5 に示す。

表 5

B ₁ 測定値 (r)		合 成 率 (%)		遊 離 (%)
遊	總	遊	總	
32.5	54.2	19.4	32.2	60

之により B₁ の遊離型のみならずエステル型も合成され, 而もエステル型が全體の 40% を占めてゐた。これまでの文献にあらはれた酵母による B₁ 合成実験は B₁ の遊離型のみについて行はれたか (芦田⁴⁾) 或はエステル型の生成が甚だしい (稻垣, 長尾⁵⁾)。

(9) アノイリナーゼによる B₁ 分解物の酵母による B₁ 合成

貝を磨碎し水を加へ 2n Hcl にて PH 4.5 とし, 更に水を加へて 3—5 倍容とし 30 $^{\circ}$, 15 分間浸出し, 遠心沈澱して上清をとる。その 5.0 cc をとり, 之に n/10 醋酸緩衝液 (PH 5.5) 2.0 cc を加へ, 更に 100 r/cc の B₁ 液 1.0 cc を加へる (盲驗及び對照にはその代りに水 1 cc を加へる)。60 $^{\circ}$, 1—2 時間作用せしめ B₁ が 99% 以上 (中には 80—90% 分解のものもあつた) 分解したことを確かめた後, 100 $^{\circ}$, 30 分加熱滅菌し, アノイリナーゼを不活化し, 冷却の後無菌的操作の下に酵母浮游液 4 cc

を加へ合成培地 7 cc を加へ 27°, 20 時間培養の後 100°, 30 分加熱して酵母を不活化し (この操作を行はなかつたものは表中*をつけて區別した)。さらにヂアスターゼ (1,100) 1 cc を加へて 37° に 1 夜放置した後 B₁ を測

定した。實驗には B₁ を加へず酵母を作用させたものと及び B₁ を加へて分解せしめたものに酵母を作用せしめたものをつくり、又夫々實驗主實驗、添加實驗を行った。(成績は表 6 に示す)

表

6

() 内の數字は B₁ を加へない時に酵母により合成された B₁ 量である。

種 類	B ₁ 添加量 (r)	B ₁ 残存量 (r)	B ₁ 測定値 (r)		B ₁ 合成量		遊/總 (%)	合成率 (%)
			遊	總	遊	總		
ヘ マ グ リ	200	0.163	40.0*	80.0*	39.8*	79.8*	47.5*	39.8*
	100	0.033	7.77*	13.3*	7.69*	13.22*	58.2*	13.2*
			(0.03)	(0.08)				
	100	0.083	7.77*	21.6	7.69	21.52	35.8	21.5
			(0.08)	(0.08)				
	100	0.2	—	23.8*	—	17.9*	—	17.9
				(5.7)				
	100	0.2	—	30.0	—	24.1	—	24.1
				(5.7)				
ア サ リ	200	1.33	—	44.5*	—	43.17*	—	21.6*
	200	0.66	—	66.5*	—	65.81*	—	32.9*
	200	0.166	40.0*	80.0*	39.8*	79.8*	47.5*	39.8*
			(0.2)	(0.2)				
	100	0.25	—	13.4*	—	9.81*	—	9.8*
シ ジ ミ	100	0.25	—	(3.34)	—	16.34	—	16.3
	200	13.3	100*	150*	87.0*	137*	63.0*	69*
	200	16.7	53.3*	83.3*	36.6*	66.6*	55.0*	33.3*
	200	35.4	133*	173*	98*	138*	71.0*	69*
シ ジ ミ	200	2.14	60*	100*	58*	93*	59.2*	49.0*
	200	10.0	25*	31.4*	15*	21.4*	70.0*	10.7*

之によつて見ると B₁ をアノイリナーゼによつて分解したものに酵母を作用せしめると明に B₁ 及びそのエステル型*3) が合成されこの點に於てヘマグリ、アサリ、シジミは何れも同様の關係を示す。尚總 B₁ 量の測定の場合 100°, 30 分の加熱により酵母を不活化した後タカヂアスターゼを作用させると B₁ の檢出値が可なり高くなり合成率がたとへること同一條件における比較により確かめられた。エステル型は合成總量の 30—65% を

占めた。

文 献

- 1) 藤田, 沼田 (1942) 日本生化學會總會演説。 (1944) 日本生化学 18 (1), 63; 18 (4), 325; 18 (4), 339.
- 2) 村田 (1944) 醫學と生物學 5 (9), 537.
- 3) 藤田, 川島: 醫學と生物學 6 (12), (1944) の豫定 (未刊)
- 4) 芦田; 農化 (1942), 18, 723, ; (1943) 19, 719.
- 5) 稻垣・長尾: 農化 (1942), 18, 81.

アノイリナーゼの研究* (第 5 報)

Studies on the Aneurinase, Report V.

山 崎 建 子
K. YAMAZAKI

前報¹⁾において B₁ をアノイリナーゼによつて分解したものは酵母によつて再び B₁ 及びそのエステル型に合成されることを明にし、その關係はヘマグリ、アサリ、シジミにおいて全く同様であつて、シジミのみに特殊の態度が見られないことを示した。而してこの事實はアノイリナーゼの作用部位がピリミジンとチアゾールとの結

合部にあることを有力に支持するものである。

著者は更に進んでアノイリナーゼによつてピリミジンとチアゾールとより B₁ が合成されるか否かを試験して見た。その結果、果して少量ながら B₁ が合成されることが確められ、その關係に於てもヘマグリとシジミとは同様の態度を示した。それでシジミの場合に B₁ を分解