プロテアーゼに及ぼす L-アスコルビン酸の影響 (第 3 報)

The Effect of L-Ascorbic Acid on the Proteinase (Part 3)

ペプシンに及ぼす L-アスコルビン酸分解物の作用について

On the action of the degradation compounds of L-ascorbic acid on the pepsin

(昭和 42 年 4 月 3 日 受 理)

守 康 則 加 納 三千子
(Yasunori Mori) (Michiko Kano)

The effects of some degradation products of L-ascorbic acid, i. e. 2,3-diketo-L-gulonic acid, furfural and 3-deoxy-pentosone, on the pepsin activity were investigated.

1. 2,3-Diketo-L-gulonic acid, one of oxidative degradation products of L-ascorbic acid, activated the enzyme.
2. 3-Deoxy-pentosone, a non-oxidative degradation product of L-ascorbic acid in a strongly acidic medium under the usual cooking temperature at pH 2.2 (5% sulfuric acid), activated the enzyme.
3. Furfural, a heat- as well as acid-degradation product of L-ascorbic acid, slightly inactivated the enzyme.

緒 言

L-アスコルビン酸(AA)は、空気中の酸素によって脱水されそのさい 2 原子の水素が失われて デヒドロ-L-アスコルビン酸(DHA)と過酸化水素を生じ、さらに DHA は加水分解をうけて、2,3-ジケトグルロン酸(DKG)を経て低分子物質へと分解される¹⁾。なお酸化過程には 1 電子移動によってラジカルであるモノデヒドロアスコルビン酸の生成も報告されている²⁾。最近 桜井ら³⁾は AA の分解を酸化的分解と非酸化的分解に大別し、後者においては AA は DHA を経ないで、とくに酸性下(pH 2.2, 5% K₂SO₄ 溶液)において 2-ケトグルロン酸(KGA)もしくは KGA-エノール型を経て、さらに脱炭酸と脱水反応をうけて分解し 3-デオキシ-L-ペントゾン(3-D-P)とフルフラールが生成されることを報告している。貯蔵および調理の条件下においても 3-D-P およびフルフラールが生起されることを示し、また D-アラボアスコルビン酸(エリスルビン酸)からも同一条件下に 3-D-P とフルフラールの生成されることを併せて報告している。これらの見地から本報においては AA と α -アミノ酸の褐変機構解明の上からさらに AA の分解物であ

る DKG, 3-D-P およびフルフラールのペプシン活性に及ぼす作用を検討し、2,3 の知見をえたのでその結果を報告する。

実験材料と実験方法

1. 2,3-ジケトグルロン酸の調製：香川⁴⁾の方法に準拠して DKG のカリウム塩を調製した。すなわち AA 8.9 g を KIO₃ 3.7 g, 蒸留水 50 ml の溶液に suspend し、1 N-KOH 50 ml を徐々に加えて 5°C に 30 分間放置し、さらにエチルアルコール 800 ml を加えて沈澱させ、該沈澱を 5°C で Büchner 漏斗を用いてエチルアルコール 200 ml, エーテル 200 ml にて順次洗い減圧乾燥する。無色、水に易溶であるが室温貯蔵中漸次褐変の傾向がみられる。

2. 3-デオキシペントゾンの調製：加藤⁵⁾の方法に準拠して調製した。すなわち D-キシロース(和光純薬製) 12.5 g に *n*-ブチルアミン 6 g, メタノール 10 ml を加え、60~65°C に 20 分間攪拌しながら加温する。室温まで冷却したのち氷酢酸 5 ml を加え 55°C に 7 分間加温し、急冷ののち蒸留水で 150 ml に希釈する。黒褐色の液にノリット A (和光純薬製) 3 g を加えて脱色し

Büchner 漏斗を用いてろ過する。ろ液が淡黄白色になるまでノーリット脱色処理を繰り返す。脱色溶液を陽イオン交換樹脂 Dowex 50(H⁺) 50 g, 10×170 mm カラムにとおしたのち流出液を N₂ ガス通気下に減圧濃縮する。やや黄色の濃縮液にエチルアルコール 5 ml を加え、さらにセルローズパウダー (和光純薬製) 10 g, 20×410 mm のカラムにとおしたのち、カラム上の吸着物質を酢酸エチル・エタノール・水 (7:2:1) の溶媒を用いて溶出した。各溶出フラクション 5 ml につき、3-D-P をペーパークロマトグラフィー (PC) と 2-チオバルビツール酸 (TBA) による呈色反応により検出定性を行なったのち、No. 25~80 のフラクションを集め N₂ ガス通気下に減圧濃縮し実験に供した。

3. フルフラール：片山化学製の特級フルフラールを用い再蒸留して実験に供した。

4. プロテアーゼ活性の測定法：前報に示すごとく Folin の変法である萩原⁹⁾の方法に準拠してプロテアーゼ活性を測定した。

実験結果および考察

1. 2,3-ジケトグルン酸の吸収スペクトルとペーパークロマトグラフィー (PC)：実験方法 (1) 項において調製した DKG-カリウム塩が単一標品であるか否かを酵素反応にさきだしてしらべた。すなわち調製 DKG のカリウム塩水溶液について、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン法⁷⁾によって DKG-カリウム塩のオサゾン (bishydrazone) をつくりその吸収スペクトルを求めた。結果は第 1 図に示されるごとく波長 390 mμ と 530 mμ 付近に λ_{max} をみとめた。香川⁴⁾は DKG-カリウム塩のオサゾンは DKG のオサゾンと同一の融点 281°C をもち、380 mμ と 529 mμ の紫外部および赤外部に λ_{max} をもち、DKG の水溶液は 230 mμ に至るまで著明な紫

Fig. 1. Absorption Spectrum of Bis-2,4-dinitrophenylhydrazone of DKG-potassium

外部吸収はみとめられないと報告しているが本標品についてもほぼ同一の結果をえた。

さらに調製 DKG-カリウム塩水溶液を試料とし、東洋ろ紙 No. 50 にスポットし、一次元上昇法により展開溶媒として *n*-ブタノール・酢酸・水 (4:1:5, 4:1:1) の上層部を用い、室温 20°C にて展開し、呈色剤として 0.1N-AgNO₃・NH₄OH (1:1), 2% DNP 試薬を用いクロマトグラフィーを行なった。結果は第 2 図に示されるごとく 2% 2,4-DNP 試薬において、R_f=0.123 に濃橙色のスポットを、R_f=0.454, R_f=0.045 にうすい黄色のスポットを示す成分がみとめられた。R_f=0.45, R_f=0.045 のスポットは DKG が不安定な物質のため一部展開中に分解したためと推考される。稲垣⁸⁾は同溶媒系における DKG の R_f 値として 0.1±0.03 と報告している。さらに本標品の室温貯蔵 8 日、15 日のものについて PC を行なったところ第 2 図にみられるごとく 2,4-DNP 試薬で呈色される濃橙色のスポットの外、2,6-DCP 試薬 (2,6-Dichlorophenol-indophenol) や B. P. B. 試薬 (ブロムフェノールブルー) で呈色される酸性物質がみとめられ、DKG-カリウム塩の分解のいちじるしいことが考えられる。したがって酵素反応には調製直後の DKG 標品を用いることにした。

Fig. 2. Paper Chromatography of DKG-potassium

2. ペプシン活性に及ぼす 2,3-ジケトグルン酸の影響：0.1% ペプシン溶液 (M/10-クエン酸・塩酸緩衝液 pH 1.6 に溶解して用いる) 6 ml に反応液中の濃度 10⁻⁴~10⁻² M の DKG-カリウム塩水溶液 4 ml を加え、37°C, 30 分間の前処理を行なった後、1% カゼイン (メルク製 Hammerstein カゼインを M/10-クエン

酸・塩緩衝液 pH 1.6 に溶かす) 溶液 10 ml を加えて 37°C, 30 分間酵素反応を行ない, 経時的に 2 ml をとり, 0.4 M-トリクロール酢酸溶液 (TCA) 2 ml を加え, 室温に 20 分間放置後遠心分離し, 上澄液 1 ml について 0.4 M- Na_2CO_3 溶液 5 ml, 蒸留水 3 ml, フォリン試薬 1 ml の順に加え, 10 分間煮沸して発色せしめた後, 島津製ボシユロム回折格子型光電比色計スペクトロニック 20 を用いて波長 650 m μ にて比色定量し, DKG-カリウム塩無添加 (対照) のものと比較してその影響をしらべた。結果は第 3 図に示されるごとく DKG により酵素活性は賦活され, とくに 10^{-2} M において酵素活性はいちじるしく賦活される。

Fig. 3. Effect of 2,3-Diketo-1-gulonic Acid on the Activity of Pepsin

Curve 1: + 10^{-4} M DKG, 2: + 10^{-3} M DKG, 3: + 10^{-2} M DKG, 4: Control (without DKG)

Enzyme was preincubated with and without 10^{-4} ~ 10^{-2} M DKG in 0.1M citrate-HCl buffer (pH 1.6) at 37°C for 30 minutes, and then the remaining activity was assayed by Folin's modified method for 1% casein in 0.1M citrate-HCl buffer (pH 1.6) at 37°C for 30 minutes.

3. 3-デオキシペンントゾンのペーパークロマトグラフィー (PC) と吸収スペクトル: 実験方法(2)項で調製した 3-D-P が単一標品であるか否かをしらべるため, 濃縮液を東洋口紙 No. 50 にスポットし, 一次元上昇法により展開溶媒として *n*-ブタノール・酢酸・水 (4:1:1) を用い室温 10°C にて展開したのち, 呈色剤としてアニリンヒドロゼンフタレート (Aniline-hydrogenphthalate) を用い検出同定を行なった。結果は第 4 図に示されるごとく R_{glucose} 1.6 に褐色がかったスポットが, R_{glucose} 3.0 にうすいスポットを示す物質がみつめられた。加藤⁵⁾によると同溶媒系における 3-D-P のペーパークロマトグラフィーにおいては R_{glucose} 2.4~3.1 のスポットがえられると報告している。

さらに 1.5×10^{-2} M の調製 3-D-P 水溶液 1 ml に TBA 試薬 (0.72% TBA 水溶液に等量の 2 M- H_3PO_4 溶液を混合したもの) 9 ml を加え, 100°C に 15 分間煮

Fig. 4. Paper Chromatography of 3-Deoxy-D-pentose

Developing solvent: *n*-butanol-acetic acid- H_2O (4:1:1). Spray reagent: aniline hydrogen phthalate

沸して発色せしめ 3-D-P の TBA 試薬 (2-Thiobarbituric acid 試薬) による呈色反応液 (暗赤色) の吸収スペクトルを求めた。結果は第 5 図に示されるごとく波長 510 m μ 付近に λ_{max} がみつめられる。加藤⁵⁾は 3-D-P の TBA 呈色反応にもとづく吸収スペクトルについて波長 508 m μ に λ_{max} をもち, また 3-D-P はきわめて不安定な物質 (中間体) であることを併せ報告している。本標品は吸収スペクトルにおいて加藤の結果とはほぼ一致をみた。

Fig. 5. Absorption Spectrum of the Color Reaction Product of 3-Deoxy-D-pentose with 2-Thiobarbituric Acid

3-deoxy-D-pentose (1.5×10^{-2} M, 1 ml) and 2-thiobarbituric acid reagent (9 ml) were heated in a boiling water bath for 15 min.

4. ペプシン活性に及ぼす 3-デオキシペンントゾンの影響: 第 3 図と同じ酵素前処理条件, 酵素反応条件において 10^{-4} ~ 10^{-2} M の濃度にて 3-D-P の酵素活性に及ぼす作用をしらべた。結果は第 6 図に示されるごとく 3-D-P は酵素活性を賦活し, とくに 10^{-2} M において酵素活性はいちじるしく賦活される。

5. ペプシン活性に及ぼすフルフラールの影響: AA 水溶液を加熱するとき, あるいは酸性下で分解するときカルボニル化合物であるフルフラールを生ずることは,

Fig. 6. Effect of 3-Deoxy-D-pentosone on the Activity of Pepsin

1: +10⁻¹ M 3-D-P, 2: +10⁻³ M 3-D-P, 3: +10⁻² M 3-D-P, 4: Control (without 3-D-P)

Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

桜井ら⁹⁾, 野村⁹⁾, 神谷¹⁰⁾, Swandish¹¹⁾ らにより報告されている。したがって 10⁻¹~10⁻² M 濃度にてフルフラールの酵素に及ぼす作用をしらべた。結果は第7図に示されるごとくフルフラールは酵素活性を軽度 to 阻害する。

Fig. 7. Effect of Furfural on the Activity of Pepsin

1: +10⁻¹ M F, 2: +10⁻³ M F, 3: +10⁻² M F, 4: Control (without F)

Experimental conditions were the same as in Fig. 3.

要 約

L-アスコルビン酸の分解物である 2,3-ジケトグルン酸, 3-デオキシペンントゾンおよびフルフラールのペプシン活性に及ぼす影響を検討し次の結果をえた。

1. L-アスコルビン酸の酸化生成物である 2,3-ジケトグルン酸は酵素活性を賦活する。
2. L-アスコルビン酸, D-アラボアスコルビン酸のとともに非酸化分解物(加熱分解物, 酸分解物)である3-デオキシペンントゾンは酵素活性を賦活する。
3. L-アスコルビン酸の加熱分解物または酸分解物であるフルフラールは酵素活性を軽度 to 阻害する。

文 献

- 1) 神谷真太郎, 中林敏郎: ビタミン, **13**, 246, 250 (1957)
- 2) Grinstead, R. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 3464 (1960)
- 3) Kurata, T., Sakurai, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **31**, 170 (1967)
- 4) 香川靖, 滝口久: 酵素化学シンポジウム, **16**, 107 (1962)
- 5) Kato, H.: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 187 (1962)
- 6) 奥貫一男, 萩原文二, 松原央: 酵素化学シンポジウム, **9**, 1 (1954)
- 7) Roe, J. H. & Oesterling, M. J.: *J. Biol. Chem.*, **152**, 511 (1954)
- 8) 稲垣長典, 相馬信子: ビタミン, **6**, 568 (1953)
- 9) 野村男次: 醸酵工, **31**, 398 (1953)
- 10) 神谷真太郎: 農化, **34**, 8, 13 (1960)
- 11) Punlon, A. P. & Swandish, S.: *Ind. Eng. Chem.*, **38**, 705 (1946)

(広島大学教育学部)