レダクトン類に関する研究†

大村 浩久

九州大学農学部食糧化学工学科

Studies on the Reductones

Hirohisa OMURA

*Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka*

レダクトン類は強い還元力を持つグループであって、その化学的ないし物理的特性は分子に含まれているエンジオール $[-C(OH)=C(OH)-]$ あるいはその OH 基の 1 個または 2 個が $NH_2(NH-R)$ 基や SH 基で置換されたエナミノール $[-C(OH)=C(NH-)-]$ 、エンジアミン $[-C(NH-)=C(NH-)-]$ 、チオールエノール $[-C(OH)=C(SH)-]$ 、エナミンチオール $[-C(NH-)=C(SH)-]$ などに大きく依存している。さらにはジケトン類のような 2 次的にこれらの構造に転換して還元力を示すものも含まれている¹⁾。

このレダクトン類は食品の加工、貯蔵、調理などにもなり褐変、香気や抗酸化能の発現、さらにはこれらに由来する栄養価の低下などにおいて、反応性に富む中間体として重要な地位を占め食品工業において注目されている。これらの変化はおもに食品成分間の相互反応によるものであって、とくにアミノカルボニル反応やストレッカー分解などが著名である。一方アドレナリンや AsA などの生理活性物質もレダクトン類に属するが、活性を示すものはごく少数に限られていて、その生化学的性質の共通性、普遍性はほとんど知られていない。しかしレダクトン類は反応性の高いものであるので、生体内においてもなんらかの作用を及ぼすことも考えられる。このことは、食生活に占める加工食品の割合が増大している現状からいって無視しえない問題を提示すると思われる。われわれはレダクトン類について、食品工業における諸問題だけでなく生理的機能の解明にも指向してきた。

レダクトン類の生理的機能に関する研究

1. レダクトン類と核酸との反応

われわれの研究室では、ウイルスの誘発に始まり、突

然変異、ホルモン、さらには食糧ないし生体成分と癌との関係など、細胞の分化および異常化に関する諸問題について 30 数年にわたり、とくに代謝および核酸を中心とした基礎研究が系統的に続けられてきたが²⁾⁻¹⁶⁾、1968 年クマザサ抽出液から分離した可溶性リグニンが腫瘍の増殖を抑制し、かつ DNA に作用して低分子化することを見いだした⁷⁾⁸⁾。リグニンは複雑な高分子物質であるので、その作用機構を解明するためこれがポリフェノール類の重合体であることからピロカテコールなどのポリフェノール類⁹⁾¹⁰⁾、さらに生体内でアミノ酸から代謝的に生成されしかもホルモンとしての生理的機能を示すドーパ、ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンなどいわゆるカテコールアミンに反応モデルとして着目した。これらもエンジオール基を持つ芳香族レダクトンであるが、いずれも抗腫瘍性を持ち、とくに Cu^{2+} の共存下において DNA や RNA 鎖を切断することを確認した¹¹⁾¹²⁾。一方 AsA は食糧成分中の代表的レダクトンであるので、これについても並行して研究を進め、AsA だけでなく DAsA、DKG、MDT などの酸化生成物も同様に腫瘍の増殖を抑制し、いずれも代謝性抗腫瘍物質であることを示した¹³⁾⁻¹⁸⁾。これらもちろん核酸と反応する。たとえば Fig. 1 に示すように、AsA は DAN 溶液の粘度を低下し、しかも Cu^{2+} によって著しく促進される。しかし Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Ag^{+} などの金属イオンはほとんど効果はなく、また Mn^{2+} や Fe^{2+} などでもわずかに助長されるにすぎない¹⁶⁾。さらに TR¹⁶⁾、2,3-ジケトグルコン酸¹⁶⁾、キシロソソ¹⁶⁾、EA¹⁷⁾、DEA¹⁷⁾、MDT¹⁹⁾ なども同様に Cu^{2+} 共存下に顕著な粘度低下作用を示すが、ジアセチル¹⁶⁾ や α -ケトグルコン酸¹⁶⁾ には効果はない。また AsA-3-P²⁰⁾²¹⁾ や TR-2-P²²⁾ のようなリン酸エステルあるいは DAsA-OPD¹⁷⁾ のように、レダクトンのエンジオール構造をブロックすると、還元力はもちろん、 Cu^{2+} が共存しても粘度低下作用を著しく減殺する。

† 本総説は昭和 52 年日本栄養・食糧学会賞の対象となったものである。

Fig. 1. Viscosity of DNA in solutions of AsA, EA and AsA-3-P.

レダクトン類によるこのような DNA 溶液の粘度低下作用はポリヌクレオチド鎖の切断に基づく低分子化を示唆するが確証を与えるものではない。しかし、中性ならびにアルカリ性において蔗糖密度勾配遠心分離を行なうと、Fig. 2 に示すように、AsA の作用により DNA の複鎖切断および単鎖切断が起こり、しかもその作用はそれぞれ微量の Cu^{2+} により助長されることが確かめられた²⁰⁾²¹⁾。この場合、DNA を 5 mM AsA および 1 mM Cu^{2+} で 37°C、4 時間反応させたが、Studier²³⁾ の式により分子量を概算すると、複鎖切断では分子量約 2.68

Fig. 2. Strand breaks of DNA by AsA.

$\times 10^8$ のピークが減少し、AsA 単独処理により約 1.14×10^7 , Cu^{2+} 共存の場合約 4.8×10^4 のピークを生じた。一方単鎖切断では約 1.86×10^7 から約 9×10^5 または約 4.6×10^4 のものに転換した。このような DNA の切断はカテコールアミン類¹¹⁾²⁴⁾, $\text{TR}^{25)}$, $\text{EA}^{21)}$, $\text{MDT}^{19)}$, $\text{DAsA}^{15)}$ などでも認められた。さらに低濃度あるいは Cu^{2+} を含まない温和な条件ではその作用力は弱く単鎖切断のみを起こすにすぎないが、条件が厳しくなるにともない複鎖切断も起こりその程度も増強した。しかし Cu^{2+} の効果はレダクトンの約 1/5~1/10 で最も高く示

Fig. 3. Strand breaks of DNA by AsA-3-P.

された。一方, AsA-3-P⁽²⁰⁾⁽²¹⁾ や TR-2-P⁽²²⁾ などでは粘度低下の場合と同様に Cu^{2+} が共存しても単鎖切断を起こすにすぎなかった。これに対して, アルカリホスファターゼで処理すると Fig. 3 に示すように複鎖切断能を回復することが観察され, エンジオール基を再生していることは明らかである⁽²⁶⁾⁽²⁷⁾。また単鎖状の変性 DNA が切断されやすいことも認められたが, さらに同じくおもに単鎖状のポリヌクレオチド鎖からなる RNA も Fig. 4 に示すように容易に切断された⁽¹¹⁾⁽²¹⁾⁽²⁵⁾⁽²⁸⁾。その作用も DNA に対する場合と同様に Cu^{2+} により強化されるが, AsA-3-P は効果がなく⁽²⁰⁾⁽²¹⁾, さらに 28 S 成分のように分子が大きいくほど分解されやすいことも観察された。これらの結果はレダクトン類が核酸と反応してこれを切断すること, しかもこの作用には分子中のエンジオール構造が必須であり, また Cu^{2+} により助長されることを明白に示す。

このような核酸に対する反応はその塩基組成にも密接な関係があり, レダクトンの作用によって DNA の T_m は変動し⁽²⁹⁾, またピリミジンのみからなるアプリン酸に優先して働きデオキシシチジル酸に相当する低分子物質も脱離した⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。一方プリンのみからなるアピリミジン酸に対する作用力は弱く, Cu^{2+} 共存下に多少分解される程度であることが認められた⁽¹¹⁾⁽¹⁶⁾⁽²¹⁾⁽³⁰⁾。Fig. 5 にはデオキシオリゴヌクレオチドに対し DAsA を作用させたのち DEAE セルロースカラムで分離した溶出パターンを示す⁽¹⁵⁾。ピリミジン・ジおよびトリヌクレオチドは

Fig. 4. Cleavage of RNA by AsA.

Fig. 5. Decomposition of oligonucleotides with DAsA+ Cu^{2+} .

A: deoxypyrimidine oligonucleotide
B: deoxypurine oligonucleotide

増減しないが, テトラ以上のデオキシオリゴヌクレオチドは分解されてモノヌクレオチドを生じた。この場合分子の大きいペンタマーのほうがテトラマーよりも分解度が著しかった。これに対してデオキシプリンオリゴヌクレオチドは同一条件の作用によってもほとんど変化はなかった。これらのことから, レダクトン類は DNA 分子中のピリミジンクラスター部に特異的に作用することが推定される。しかもこの反応には塩基部分のアミノ基が関与することも, 塩基類⁽¹⁶⁾やデアミノ核酸⁽³¹⁾に対する反応性から示唆された。

レダクトン類による核酸切断反応における Cu^{2+} の促進効果はきわめて重要である。その機作を解明するため, カテコールアミン類と DNA との相互作用を追及し, これらのレダクトンが Cu^{2+} 共存下に酸化型および還元型で DNA に結合することを示唆した⁽²⁹⁾。またその過程で Cu^{2+} によるレダクトンの酸化は Fig. 6 に示すように, DNA 自体⁽²⁹⁾, あるいは塩基, ヌクレオシド, ヌクレオチドなどの構成成分⁽³²⁾によって促進または抑制されるこ

Fig. 6. Stimulative effect of base, nucleoside and nucleotide on the oxidation of noradrenalin by Cu^{2+} .

A: Ade, Ado, AMP, B: Cyt, Cyd, CMP, C: Thy, dThd, D: GMP, E: Control

と、しかもその効果は反応に関与する両成分の種類により異なり、一種の反応調節が行なわれていることが推定された³²⁾。さらにこれに関連してアデニンを含む補酵素 NADH_2 が Cu^{2+} の共存下に、芳香族レダクトンの酸化還元反応に対して、ニコチンアミド部分の還元作用、AMP 部分の酸化促進と互いに逆の 2 官能性効果を持つことも明らかになった³³⁾。

一方この核酸成分による酸化促進の機構を解明するため、その効果の最も著しいアデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリン系について反応速度論的に解析し、レダクトンの初期の酸化反応は典型的な Michaelis-Menten 型の挙動を示すことを明らかにした³⁴⁾。こうして Fig. 7 に示すように、アデニンおよびノルアドレナリンは互いに独立し、またどの順序でも Cu^{2+} に結合し、アデニン- Cu^{2+} -ノルアドレナリン 3 者混合錯体の形成を経てノルアドレ

Fig. 7. Oxidative process of noradrenaline catalyzed with adenine- Cu^{2+} .

Fig. 8. Scheme for the structure of the adenine- Cu^{2+} -noradrenaline complex and intermediates in the oxidation of noradrenaline.

ナリンが酸化される無秩序系逐次型の機構に従うこと、この場合実験的に求められた平衡定数から Cu^{2+} にまずノルアドレナリンが配位し、次にアデニンが配位する経路に平衡が傾いていると推定された。3 者混合錯体上では Fig. 8 に示すような電子の移動が起こり、 Cu^{2+} は Cu^+ に還元され、その後溶存酸素によって Cu^{2+} に再酸化されるが、一方ノルアドレナリンはフリーラジカルの生成を経て酸化型ノルアドレナリンに解離されると考えられる。酸化にともなうフリーラジカルの生成は AsA, TR, レダクチン酸など種々のレダクトンについて ESR スペクトルにより検出されている³⁵⁾。また村田³⁶⁾によって AsA によるバクテリオファージの失活作用は生成したフリーラジカルのウイルス核酸の切断に基づく主張されている。しかしこのような Cu^{2+} と共役した核酸の切断作用はレダクトン類だけでなく、後述するような種々の薬剤によっても同様に起こり、しかもこれに塩基特異性が見られることなどから、さらに詳細な解明が必要であろう。

こうしてレダクトンの核酸に対する反応性とくに切断作用がエンジオール化合物によって確認されたが、さらにこの作用はエンジオールだけではなくその他のレダクトン類にも普遍的な特性であるか否かを明らかにしなければならない。Boyland および Watson³⁷⁾ は必須アミノ酸トリプトファンの代謝中間体である 3-HK および 3-HAA を錠剤としてマウスの膀胱内に挿入して発癌に成功している。われわれはこの癌原性トリプトファン代謝中間体がともに *o*-アミノフェノールであって分子内にエナミノール構造を持つアミノレダクトンであることから核酸に対する反応性を試験した。その結果、3-HK および 3-HAA もエンジオール化合物と同様に DNA 溶液の粘度を低下させるが、出発物質であるトリプトファンや代謝産物であるキノリン酸、ピコリン酸、ニコチン酸、アントラニル酸などでは Cu^{2+} を加えても明らかな粘度低下作用は認められなかった³⁸⁾。また 3-HK および 3-HAA により、DNA だけでなく RNA の切断も蔗糖密度勾配遠心分離法によって証明された³⁹⁾⁴⁰⁾。さ

Fig. 9. Sedimentation patterns of DNA treated with reductones.
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA, 0.5 mM reductones, 50 μM Cu^{2+} , 37°C, 5 min

らに DNA の T_m も低下し塩基組成の変動が見られたが、この場合 AG/CT にはほとんど変化はなく GC/AT の減少が認められ、このエナミノール化合物はグアニンまたはシトシン部分に作用すると考えられる³⁸⁾。

他方エンジオール化合物の OH 基はアミノ基と縮合しやすいので、われわれは最も構造の簡単な代表的エンジオール化合物である TR と種々のアミノ酸との縮合物を結晶状に合成してその性質を解明している^{22)25)41)~49)}。この縮合物もアミノレダクトンであって強い還元力を示すが、まったく同様に DNA および RNA を低分子化し、しかもそのヌクレオチド鎖の切断は反応の初期に比較的速やかに行なわれることを超速心分離によって確認した²⁵⁾。

次に核酸に対する切断作用はレダクトン類の種類によって異なるか否かを追究した。エンジオールとして AsA、エナミノールとして AsA からの赤変にともない中間的に生じる ScA、さらにチオールレダクトンとして MHC を合成し同一条件でその作用力を比較した (Fig. 24)⁵⁰⁾。厳密な定量的比較値を求めることは現在のところ困難であるが、DNA の粘度低下、DNA および RNA の蔗糖密度勾配遠心分離パターン、アプリン酸およびアピリミジン酸に対する反応性などにおいて AsA と ScA とに顕著な差はほとんど認められなかった。しかし MHC も明白に核酸と反応したがその作用力はかなり低かった。Fig. 9 に一例を示す。

他方 TR の作用力はアミノ酸の縮合により若干弱くな

る傾向があるように認められた²⁵⁾。

われわれは次のような細胞の分化ないし異常の誘起に関与する諸物質が核酸切断能を持つことを証明し、一括して核酸切断剤と称している²⁸⁾。しかもこれらはひとしく Cu^{2+} により効果を高めることが観察された。

ウイルスおよび突然変異誘起物質：亜硝酸⁵¹⁾、ヒドロキシルアミン^{51)~56)}、オキシム¹²⁾²⁸⁾⁵⁶⁾⁵⁷⁾、過酸化水素⁵⁸⁾⁵⁹⁾、トリエチレンメラミン⁶⁰⁾⁶¹⁾

発癌性物質：3, 4-ベンズピレン⁵⁹⁾、20-メチルコラリスレン⁵⁹⁾、ヒドロキシウレア⁶²⁾⁶³⁾、MNNG²⁸⁾⁶⁰⁾、3-HK³⁹⁾⁴⁰⁾、3-HAA³⁹⁾⁴⁰⁾

制癌性物質：マイトマイシン C²⁸⁾⁵⁹⁾、リグニン⁷⁾、キシラン^{64)~66)}、家蚕多角体たん白質⁶⁷⁾、AsA オキシダーゼ⁶⁸⁾⁶⁹⁾、ポリフェノールオキシダーゼ⁶⁹⁾

ホルモン：ステロイド系ホルモン (エクジステロン、テストステロン、エストラジオール、コルチゾン)²⁸⁾³⁰⁾⁵⁷⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾、カテコールアミン系ホルモン (アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン、ドーパ)¹¹⁾¹²⁾²⁴⁾²⁸⁾³⁰⁾

その他：卵アルブミン⁷²⁾

AsA 関連物質 (AsA, DAsA, DKG, MDT, EA, DEA, TR など) やカテコールアミン類も制癌性物質の中にも含まれるが、これを含めて一般にレダクトン類も広く核酸切断能を持ち、核酸切断剤の一員であることが確認された。

2. レダクトン類の酵素に対する作用

1) DNA, RNA, たん白質合成系

山藤は 30 年余にわたる一連の系統的な研究に基づいて細胞の分化および異常の誘起に関する物質がいずれも核酸切断能を持つことから、これら諸現象における主要な始動過程の一つが染色体（遺伝子）DNA の適切な切断にあるとの推定に達し、Fig. 10 のような実験仮説を提示した⁵⁾⁶⁾。この生物的諸過程と DNA 切断との相関関係についてはさらに解明を要する多くの問題点を含む。DNA は遺伝情報を帯びた生命現象における中心的存在であって、DNA 分子になんらかの変化を生じると生体内で 2 次的に種々の変動を誘起することが考えられる。この過程はとくにセントラルドグマ、すなわち DNA の複製、転写、翻訳により概括して説明される。DNA に変化を生じると複製あるいは転写における DNA のプライマー効果に変動を生じて DNA ないし RNA の生成量やその性質が異なり、それにともなっていたん白質合成系も変化し、最終的に種々の生命現象に影響を及ぼすことが理解される。この推定を追究するため、DNA をレダクトンで処理し、これをプライマーとする DNA および RNA ポリメラーゼならびにたん白質合成系への影響を試験した。

E. coli B から DNA ポリメラーゼを調製し、レダクトン類で処理した DNA をプライマーとして活性を測定すると、その作用条件によって活性の上昇または低下が認められた²¹⁾⁷³⁾。たとえば Fig. 11 に示すように 1 mM AsA 単独で 37°C, 60 分間処理すると、未変性の複鎖 DNA ではそのプライマー活性は上昇したが、10 μ M Cu²⁺ とともに処理すると逆に低下した。一方、熱変性した単鎖 DNA ではともに活性を上昇し、この場合 AsA 単独ではその程度は低く、Cu²⁺ を加えると増強された。また短時間の処理では活性の上昇、長時間では低下が認

Fig. 10. YAMAFUJI effect* causing cellular differentiation and anomalization.

Fig. 11. Priming activity of DNA treated with AsA for DNA polymerase.

められた。処理濃度によっても活性の変動度は異なり、AsA 濃度 0.1 mM でプライマー活性の上昇度は最高に達しそれ以上の濃度では急激に低下した。Cu²⁺ が共存すると DNA 切断力が高められその程度も増強されるので活性上昇度のピークは低濃度側に移動した。このような現象は DAsA, MDT, ScA, MHC などでも観察されたが AsA-3-P 処理によっては活性にほとんど影響なく Cu²⁺ 共存下に若干の上昇が認められるにすぎなかった⁷³⁾。RNA ポリメラーゼの場合にも同様の傾向を示し、AsA⁷³⁾, MDT⁷³⁾, ScA⁷³⁾, MHC⁷³⁾, 3-HK³⁹⁾⁴⁰⁾, 3-HAA³⁹⁾⁴⁰⁾, カテコールアミン²⁸⁾⁶⁰⁾などでもプライマー活性の変動が起こったが AsA-3-P では変化がなく、いずれもレダクトン構造が重要であることを示している。この変動が DNA の切断に依存していることは、亜硝酸⁵⁶⁾、ヒドロキシルアミン⁵⁶⁾、オキシム⁵⁶⁾、MNNG²⁸⁾、コルチゾン²⁸⁾などその他の核酸切断剤によっても観察されることから推定される。しかもその程度は DNA ポリメラーゼの場合と同様であって、温和な処理によって DNA に単鎖切断のみが認められた場合プライマー活性は上昇したが、作用条件が厳しく複鎖切断も起こると活性が低下することをアドレナリンおよび MNNG によって確かめた⁷⁴⁾。AsA 処理濃度 0.1 mM で活性上昇はピークに達し、10 mM ではかえって低下することもこれを支持する⁷³⁾。

さらに転写開始に関与しているシグマ因子を除去したコア RNA ポリメラーゼに対するプライマー活性も Fig. 12 から見られるように AsA 処理によって上昇し⁷³⁾、MNNG⁷⁴⁾でも証明したように、DNA の単鎖切

Fig. 12. Effect of DNA pretreated with AsA or AsA-3-P on core RNA polymerase activity.

断部位が RNA 合成の停止点だけでなく開始点にもなりうることを示唆している。このようにして、レダクトンの処理によって起こる DNA の切断様式ならびに程度が両ポリメラーゼのプライマー活性に変動を生じ、DNA の複製ならびに RNA への転写に影響を及ぼすことが考えられる。

ポリヌクレオチド鎖の切断にともなう DNA の RNA ポリメラーゼプライマー活性の変化は RNA の生成量に変動をきたし、最終的にたん白質の合成に影響すると考えられる。他方、レダクトン類は DNA だけでなく RNA も切断する。たん白質の合成にはリボゾームないしポリゾームの RNA が中心になっているので、これら合成された RNA や粒子中の RNA に変化を生じてもたん白質の合成は変動すると思われる。

レダクトン類による DNA の切断は供試した DNA 標品の純度によってその程度は異なり、純度が低いほどすなわち核酸にたん白質などが結合しているほど切断されにくい。切断はもちろん起こっていることを観察した⁴⁰⁾。粒子中の RNA についてもこれを確かめるため、マウス肝臓から調製したリボゾームをレダクトンで処理したのち RNA を抽出して蔗糖密度勾配遠心分離を行なった⁷⁵⁾。Fig. 13 は 5 mM AsA と 50 μ M Cu^{2+} とで 37°C, 60 分間処理した結果であって、RNA は粒子中でも切断されることが確かめられた。ScA, MHC によっても同様であった。またポリゾームを 2 mM AsA 単独で処理した場合にも、Fig. 14 に明らかなように、モノマーおよびダイマーの増加およびペンタマー以上の画分の減少が示された。このようなポリゾームの崩解は MDT, ScA, MHC などでも認められたが、AsA-3-P は無効であった⁷⁵⁾。

Fig. 13. Sedimentation pattern of rRNA from ribosomes treated with AsA + Cu^{2+} .

Fig. 14. Degradation of polysomes by AsA.

次にポリゾームおよび pH 5 酵素画分からなるたん白質合成系での内因性 RNA による ^{14}C -ロイシン、ポリ U を加えた反応系における ^{14}C -フェニルアラニン、さらに肝臓切片による ^{14}C -アミノ酸混合物のとり込みは、いずれも AsA, MDT, ScA, MHC などのレダクトン処理によって変動するが AsA-3-P ではほとんど影響はないことが認められた⁷⁵⁾。Table 1 にその例を示す。

このようにして、レダクトン類の作用による DNA の切断は、初めに推定したように、DNA の複製、転写、翻訳の各過程の活性に 2 次的に影響を及ぼすことが明らかになり、Fig. 10 に示す山藤効果はさらに明瞭に理解される。

Table 1. Effect of reductones on the incorporation of ^{14}C -Phe depending on poly U by the polysomes and pH 5 fraction.

Reductones	Radioactivity incorporated (cpm/mg of RNA)	Relative activity
Control	3.69×10^5	100
AsA	3.23	87
MDT	3.36	91
ScA	1.76	48
MHC	1.75	47

Reaction mixture: polysomes 1 E_{260} unit, pH 5 fraction 1 mg protein, poly U 25 μg , ^{14}C -Phe 10 nmoles (0.52 μCi), ATP 0.5 μmoles , phosphoenolpyruvate 2.5 μmoles , pyruvate kinase 25 mg, MgCl_2 2.5 μmoles , KCl 12.5 μmoles , Tris buffer (pH 7.6) 12.5 nmoles and reductone 0.1 mM (final conc.); Total 250 μl .

2) グリオキサラーゼ系

最近 Szent-Györgyi⁷⁶⁾ は多細胞生物の増殖調節について仮説を提唱し、メチルグリオキサールに増殖抑制因子、グリオキサラーゼに増殖促進因子としての役割があることを推定した。これは発癌制癌との関連からも注目され、とくに酵素グリオキサラーゼの阻害物質は制癌剤検索の立場からも興味を持たれている。この酵素系は2種の酵素、グリオキサラーゼ I (S-lactoylglutathione methylglyoxal-lyase (isomerizing), EC (4.4.1.5) とグリオキサラーゼ II (S-2-hydroxylacyl glutathione-hydrolase EC 3.1.2.6) と補酵素、還元型グルタチオンから成り、基質メチルグリオキサールはグルタチオンと溶液中でヘミメルカプタール結合体を作り、この結合体がグリオキサラーゼ I によって S-ラクトイルグルタチオンに変えられ、それがグリオキサラーゼ II によって乳酸とグルタチオンとに水解される。TR の構造はメチルグリオキサール (α -ケトアルデヒド) に類似しており、とくに酸化型レダクトンは基質アナログと称してよい。

そこで肝臓ならびに酵母のグリオキサラーゼ系⁷⁷⁾ とくにグリオキサラーゼ I⁷⁸⁾ を精製し、その活性に対する影響を試験したところ、Table 2 に示すように、鎖状ならびに芳香族レダクトンが阻害することを認めた。しかし核酸切断の場合とは異なり、AsA-3-P にもかなりの阻害効果があるが DAAs にはほとんど効果は認められな

Table 2. Inhibition of glyoxalase I by some reductones.

Reductones	Final conc. (mM)	Inhibition (%)	
		ox liver	yeast
Aliphatic			
Ascorbic acid	0.60	87	52
Triose reductone	0.60	44	49
Ascorbic acid-3-phosphate	0.60	62	40
Dehydroascorbic acid	6.0	12	0
Aromatic			
Catechol	6.0	82	37
Resorcinol	6.0	17	53
Hydroquinone	6.0	44	84
<i>p</i> -Benzoquinone	0.60	55	89
	0.12	—	40

かった。p-ベンゾキノンでも強い阻害が見られたが、この場合キノンは酵素たん白質のアミノ基やスルフヒドリル基のほかにグルタチオンとも反応することが示唆された。また AsA の阻害様式は反拮抗的であった。

3. *in vivo* でのレダクトン類の作用

レダクトン類が DNA および RNA に作用しそのポリヌクレオチド鎖を切断しうることが明らかになり、それに基づいて種々の生理的機能を発揮することが推定される。しかしこれまでは *in vitro* の実験によるものであるので、さらに *in vivo* での機能を確かめなければならない。

1) 組織培養細胞のレダクトン処理

これまで明らかにしたレダクトン類の基本的作用は核酸の切断にある。そこで細胞内においてもこのような核酸の変動が起こるか否かをまず試験した⁷⁸⁾⁸⁰⁾。

組織培養細胞 (RFL および HeLa) に ^3H -チミジンを投与して DNA を標識し、その細胞をアドレナリン、ノルアドレナリンなどの芳香族レダクトンで処理し、これから DNA を抽出して超遠心分析を行なうと *in vivo* でも染色体 DNA の単鎖ならびに複鎖切断が起こることが確かめられた。その切断の程度はもちろん用いたレダクトンの種類や処理濃度、時間などの条件で異なった。さらに単鎖切断は速やかにしかも容易に修復されるが、複鎖切断は部分的に再結合される修復の容易なものと、比較的困難なものとの2種が観察された。しかも後者の切断も致死的ではなく、培養細胞はレダクトン処理後も増殖を続け、たとえば Fig. 15 に示すように、25 μM アドレナリンで5時間処理したのち正常培地に90日間培

Fig. 15. Double strand breaks and partial re-pair of DNA in RFL cells. Untreated (A), treated with 25 μ M adrenaline for 5 hr (B) and cultured in the normal MEM medium for 90 days after the treatment (C).

養した細胞の DNA は未処理細胞の DNA よりも分子は小さいままであった。

しかしこの DNA の低分子化にともない細胞の生理的活性に種々の乱れを生じた。すなわち、細胞の酸不溶性画分への ^{3} H-チミジンのとり込み (DNA の生合成) はアドレナリン、ノルアドレナリン処理によって増強されたがドーパではかえって低下した。また乳酸脱水素酵素

Table 3. Insensitivity of adrenaline-treated cells to Murine Leukemia Virus (Gross) infection.

Treatment	No. of giant cells per dish
Untreated	4300 $\pm$ 300
25 μ M, for 3 hr	4200 $\pm$ 200
2.5 μ M, for 5 hr	3800 $\pm$ 250
25 μ M, for 5 hr	1250 $\pm$ 50
c.a.a.*	1350 $\pm$ 150

*c.a.a.: The cells were cultured in the normal medium for 90 days after a 5 hr-contact with 25 μ M adrenaline (Fig. 15, C).

Rat fetal cell sheet in a petri dish was treated with 2.5 or 25 μ M adrenaline. The sheet was washed twice to eliminate excess adrenaline. The virus was added to the sheet in fresh medium. After 6 days, giant cells produced were stained and counted.

や RNase の活性も低下したがカタラーゼには変化はなかった。さらに Table 3 に示すように、レダクトン処理をした培養細胞にマウス白血病ウイルスを感染させたところ、それにともなう巨大多核化は抑制された。

2) 細菌の増殖抑制

DNA の切断にともない考えられる影響は細胞の増殖に対するものである⁸¹⁾。そこで *E. coli* K 12 および *B. subtilis* 168 M を用い、その対数期に TR, AsA ないし AsA-3-P を加えたのち引き続いて増殖を追及した。*E. coli* K 12 の増殖は Fig. 16 に明らかなように 10 mM TR で完全に抑制された。また Cu^{2+} を加えるとその抑制効果も著しく高められ、1 mM でも完全に阻止した。AsA でも同様の傾向は観察されたがその効果は TR に

Fig. 16. Effect of TR plus Cu^{2+} on the growth of *E. coli* K 12.

Fig. 17. Macromolecular synthesis of *E. coli* K 12 treated with 10 mM AsA or TR.

Table 4. Effect of reductones on the growth of sarcoma 180.

Reductone	Inhibition (%)	Reductone	Inhibition (%)
Enediol reductone			
TR	41	Dopa	32
TR+Cu ²⁺	21	Dopa+Cu ²⁺	66
AsA	51	Dopamine	42
AsA+Cu ²⁺	68	Dopamine+Cu ²⁺	83
AsA-3-P	18	Noradrenaline	46
AsA-3-P+Cu ²⁺	25	Noradrenaline+Cu ²⁺	66
DAsA	61	Adrenaline	73
DAsA+Cu ²⁺	73	Adrenaline+Cu ²⁺	84
DKG	52	Catechol	60
EA	30	Catechol+Cu ²⁺	83
EA+Cu ²⁺	41	Chlorogenic acid	57
DEA	41	Chlorogenic acid+Cu ²⁺	68
DEA+Cu ²⁺	45	Melanoidin	68
MDT	30	Melanoidin+Cu ²⁺	60
MDT+Cu ²⁺	68		
AsA-6-Palm	54		
DAsA-OPD	30		
Amino reductone			
ScA	28	TR-Trp	13
ScA+Cu ²⁺	38	TR-Trp+Cu ²⁺	25
TR-Phe	31	TR-Leu	74
TR-Phe+Cu ²⁺	33	TR-Leu+Cu ²⁺	51
TR-Met	36	3-HK+Cu ²⁺	30
TR-Met+Cu ²⁺	3	3-HAA+Cu ²⁺	37
Thiol reducton			
MHC	54	Hydroquinone-N-acetylcysteine	63
MHC+Cu ²⁺	48		

After inoculation of sarcoma, the reagent was administrated by subcutaneous injection daily or every other day for about 2 weeks. The dose was 17 μ moles reductone and 0.34 μ moles Cu²⁺, except 2.1 μ moles MHC and 2.0 μ moles hydroquinone-N-acetylcysteine.

くらべて弱く、10 mM では増殖をほとんど抑制せず、100 mM でもわずかに抑える程度であった。しかし Cu²⁺ を加えると TR の場合と同様に増強され 10 mM AsA と 1 mM Cu²⁺ の共働作用で完全に阻止した。*B. subtilis* 168 M に対しても類似の増殖抑制効果を示した。またこれにともなう、細菌による ³H-チミジン、³H-ウラシル、³H-ヒスチジンのとり込み、すなわち DNA、RNA およびたん白質の生合成も抑えられた。この場合も、Fig. 17 に明らかなように、TR の効果は AsA を凌駕した。一方 AsA-3-P はむしろ細菌の増殖を促進する傾向があり、Cu²⁺ はこの促進効果を低下させた。

さきに DNA をレダクトンなど核酸切断剤で処理する

と DNA および RNA ポリメラーゼに対するプライマー活性はその作用条件によって変動することを認めた。このことは核酸の生合成に影響を及ぼすことを示唆するが、他方生体内で染色体 DNA の変化にともない酵素活性に変動を生じることも培養細胞で確かめた⁸⁰⁾。細菌でも同様のことが推定される。*B. subtilis* MU12-U17 の対数期に 50 μ M または 250 μ M アドレナリンを 37°C、15 分間接触させたのち除去し、さらに 90 分間正常培地で振盪培養した細胞から DNA ポリメラーゼを調製しその活性を測定したところ、酵素標品の活性は高くとくに 50 μ M では約 2 倍に達した。他の核酸切断剤によっても、その種類、条件などに従い種々の影響を受け、

たとえば MNNG ではほとんど差はないが、グルコースオキシムやマイトマイシンCでは活性化し、コルチゾンでは逆に低下した。DNA リガーゼ活性も核酸切断剤の投与により変動し、グルコースオキシムやマイトマイシンCでは活性を高めたがコルチゾンでは抑えられた。しかしアドレナリンは MNNG とともにほとんど影響しなかった⁸²⁾。

3) 抗腫瘍性

はじめに述べたように本研究は食糧成分と癌とに関する基礎研究における抗腫瘍リグニンの分離、カテコールアミン類および AsA 関連物質の抗腫瘍性の確認ならびにその作用機構の解明から発展してきたものであって、とくに抗腫瘍性と核酸切断能との関係が基本となっている。われわれは研究の進展にともない、そのつど二、三の腫瘍とくにマウスの腋窩に移植した固型腫瘍 sarcoma 180 の増殖に及ぼす影響を試験した。Table 4 にレダクトン類で得られた効果を一括して示す。もちろんその結果は試験により多少変動することは免れないが、少なくとも一応の傾向は認められた。こうしてレダクトン類が sarcoma 180 の増殖をある程度抑制することが示された。その効果はエンジオールおよびチオールレダクトンで明らかである。しかも *in vitro* での核酸切断反応と同じように、 Cu^{2+} により効果は高められ、AsA-3-P あるいは DAsA-OPD のようにレダクトン構造をブロックすると低下する。これに対してアミノレダクトンの効果は比較的に低く、3-HK や 3-HAA のように³⁷⁾ 発癌に傾いていることが推定される。これまで試験したレダクトン類では AsA 関連物質やカテコールアミン類の効果が比較的に高いようである。このような AsA の機能は高宮⁸³⁾によっても認められ、また Cameron および Pauling⁸⁴⁾ も最近その臨床結果を報告している。われわれはこれに関連してカボチャから精製した AsA オキシダーゼ⁶⁸⁾や椎茸のポリフェノールオキシダーゼ⁶⁹⁾の酵素たん白質も抗腫瘍性ならびに核酸切断能を示すことを認めた。この両酵素がともに銅たん白質であることは、核酸切断における Cu^{2+} の機能と関連して興味深い。他方、村田³⁶⁾は AsA によるバクテリオファージの失活作用を認め、われわれと同じくこれが核酸の切断に基づくことを主張している。

癌の場合にはきわめて複雑であって単純に DNA の切断のみをもって解釈することはむずかしい。最近グリオキサラーゼやホスホジエステラーゼの阻害剤が抗腫瘍性物質の検索に関連して注目されているが、レダクトン類の阻害効果も、その抗腫瘍性の理解に役立つものと思われる。

4) 突然変異能

1951 年、山藤⁸⁵⁾はウイルス、突然変異、癌の間に顕

著な類似性があることを指摘し、これらは細胞内遺伝子における共通した様式の変化によってひき起こされることを推定した。これはその後の系統的研究によって Fig. 10 に示すような DNA の適切な切断が想定された。この仮説は多くの証明が得られつつある。たとえば、家蚕多角体ウイルス病が亜硝酸、次亜硝酸、ヒドロキシルアミン、オキシムなど無機窒素代謝中間体の投与によって誘発されるが、一方これらはいずれも突然変異誘起能を持ち、しかも核酸を切断する。また近年、発癌剤の検索に微生物に対する突然変異能の有無が広く利用されていることもよく知られている。

したがってレダクトン類が核酸切断能ならびに抗腫瘍能を示すことから、条件によっては突然変異も起こることが考えられる。事実、Stich⁸⁶⁾らは AsA に突然変異能があることを確かめた。われわれも発癌物質の予備的検索に現在最もよく用いられている Ames 系の一つ、*Salmonella typhimurium* TA100 を用いて、TR、AsA および AsA-3-P 突然変異能を追究した⁸⁷⁾。Fig. 18 に示すように、TR ないし AsA はある特定の条件において突然変異を誘起することが認められた。とくに AsA はビタミンCとして重要な食糧成分であるので、これが突然変異能を示すことはきわめて重大な問題を提起すると思われる。しかしその誘起条件は厳密に限られたものであって、TR の場合 5 mM 前後においてのみ有効であるが Cu^{2+} を加えると 1~5 mM 程度となり、10

Fig. 18. Effect of TR or TR plus Cu^{2+} and AsA plus Cu^{2+} on the revertants of *S. typhimurium* TA 100.

mm 以上ではまったく活性は見られない。AsA 自身には突然変異作用および 50 mm までは致死効果もほとんどなかったが、これに 1/1,000 ないし 1/5,000 程度の Cu^{2+} を加えると 5 mm 前後でのみ突然変異が起こり、またそれより高濃度で致死作用も現われた。いずれにしても Cu^{2+} の共働による突然変異能の発現は核酸切断の場合に類似している。しかし核酸切断においては Cu^{2+} はレダクトンの 1/10~1/5 程度で最高の活性を示すが突然変異では著しく少量であって 1/1,000 程度であり、それ以上では致死となる。これに対して AsA-3-P にはほとんど効果はなく、突然変異の発現においても抗腫瘍性や核酸切断におけると同様エンジオール構造が重要であることを示している。

5) 蛹化作用

山藤の仮説 (Fig. 10) において、細胞の分化、異常化ないしこれに関連する諸過程と DNA 切断との相関関係についてはさらに精密な解析を要し、たとえば細胞の種類、DNA 切断の様式、程度ならびに位置、あるいは修復力の強弱、切断と修復との均衡度などに応じてそれぞれの生物的諸現象に導かれると考えられる。これには精細な、とくに構造的追及などが必要であるが、いずれにしても DNA の適切な切断が共通の基本的要因であると推定することは妥当であろう。ウイルス誘発物質や発癌物質が突然変異を起こし、発癌剤の適切な使用が癌細胞の増殖を抑制することなどもこの仮説から理解され、またレダクトン類が種々の機能を示すこともこれを支持する。したがってレダクトン類の機能にはさらに分化との関連性があることも推定される。

分化の適例として昆虫の変態がある。家蚕は微量の蛹化ホルモン、エクジソンによって蛹化が起こされる。さらに、多少作用力は弱い、コルチゾン、エストラジオール、プロゲステロン、テストステロンなどにも蛹化誘導力があり、これらステロイドホルモンは DNA を切断することも認められた⁵⁷⁾。もし最終的に蛹化に導くような DNA の切断が他の核酸切断剤によっていくらかでも起こるならばこれらの薬剤によっても蛹化が誘起されることは可能であろう。事実、Table 5 に示すように、カテコールアミンのような芳香族レダクトンによっても家蚕の蛹化が起こり、しかも微量の Cu^{2+} によって促進されることが明らかになった⁵⁷⁾。もちろん蛹化力の差異は各薬品の特異性に依存し、レダクトン類はホルモンにくらべて大量に投与しなければならないことは当然であると考えられる。

こうしてレダクトン類が種々の生理的機能を示すことは明らかになったが、たびたび述べたように、これらはいずれもエンジオール構造などレダクトン類の特性に基づく DNA および RNA の切断に依存していると考え

Table 5. Induction of pupariation of *Bombyx mori* by steroid hormones and catechol amines.

Inducer	Inducing effect in %
Ecdysterone, 10^{-5} M	65
Cortisone, 10^{-5} M	45
Estradiol, 10^{-5} M	20
Progesterone, 10^{-5} M	20
Testosterone, 10^{-5} M	10
Control	5
Adrenalin, 10^{-2} M	30
Noradrenalin, 10^{-1} M	20
Control	5
Ecdysterone, 10^{-6} M	30
Ecdysterone, 10^{-6} M + CuSO_4 , 10^{-3} M	60
Control	0
Dopa, $5 \cdot 10^{-3}$ M	15
Dopa, $5 \cdot 10^{-3}$ M + Cu SO_4 , 10^{-3} M	70
Dopamine, 10^{-2} M	10
Dopamine, 10^{-2} M + CuSO_4 , 10^{-3} M	60
Dopamine, 10^{-2} M + CuSO_4 , 10^{-5} M	
+ Testosterone, 10^{-5} M	80
Noradrenalin, $2 \cdot 10^{-2}$ M	12
Noradrenalin, $2 \cdot 10^{-2}$ M + CuSO_4 , 10^{-3} M	50
Noradrenalin, $2 \cdot 10^{-2}$ M	
+ CuSO_4 , 10^{-3} M + KCl , $5 \cdot 10^{-1}$ M	70
Adrenalin, $2 \cdot 10^{-3}$ M	20
Adrenalin, $2 \cdot 10^{-3}$ M + CuSO_4 , 10^{-3} M	55
CuSO_4 , 10^{-3} M	7
Control	7

られる。これらは食餌により摂取され、また代謝によって生成されて、生体内でその機能を発揮するものと思われる。たとえば、人体は約 60 兆の細胞からなり、そのうちの相当数、数十億のものが毎日死滅した新生するといわれているが、その中には癌化の機会に遭遇する危険にあるもの、気がつかない間に癌化したもの、あるいは治癒したものなども幾分含まれていることが想像され、レダクトン類はその初期癌化の防除にも役立っていることが考えられる。

食品の褐変および抗酸化能に関する研究

1. アミノレダクトン

アミノカルボニル反応やストレッカー分解などは食品の褐変ないし特殊の香気や抗酸化能の発現における主要

な反応であると考えられている。前者においては、糖とアミノ化合物とが反応して *N*-置換グリコシルアミン、アマドリ転位生成物、オゾンあるいはジカルボニル化合物などを経てメラノイジンを生成するが、ここでアマドリ転位生成物のエノール型が真の反応中間体であってエナミノール構造を持ったアミノレダクトンである。またストレッカー分解は褐変などと同じく食糧成分間の相互反応によって生じるジカルボニル化合物が α -アミノ酸と反応して炭酸ガスを放出し α -アミノ酸よりも炭素数が1個少ないアルデヒドとアミノレダクトンとを生じ、レダクトンは引き続いてピラジン類などに変化すると推定されている。他方アミノカルボニル反応生成物には抗酸化能も発現することや⁸⁸⁾、メラノイジン色素にレダクトン構造が含まれていること⁸⁹⁾なども報告されている。したがって、これら食品の加工、貯蔵、調理などにもなる諸反応において、レダクトン類とくにアミノレダクトンが中間体として重要であることは明らかであるが、反応は複雑であってそれを分離同定し、かつ褐変ないし抗酸化能発現の機構を解明することは困難である。エンジオールレダクトンのOH基はアミノ基と容易に縮合してエナミノールあるいはエンジアミン構造をとることが知られているので、最も構造の簡単な代表的エンジオールであるTRを主体として研究を進めた。

TR と *p*-アミノサリチル酸、グアニン、アデニン、ヒドロキシルアミン、グルコースオキシム、ガラクトースオキシム、尿素、ヒドロキシウレアなど種々の含窒素化合物との反応を吸収スペクトルやクロマトグラフィーによって追及し、アミノ化合物のほかオキシイミノ化合物もTRと反応することを確かめた⁴¹⁾。またTRは種々のアミノ酸とも反応して褐変するが、その程度はアミノ酸の種類により異なり、メチオニン、スレオニン、システイン、グルタミン酸、アスパラギン酸などが顕著である⁴²⁾⁴³⁾。一方 Cu^{2+} が共存する場合、グリシン、アスパラギン酸、トリプトファン、アルギニン、フェニルアラ

Fig. 19. Preparation of TR-Trp.

ニンなどで強く褐変した⁴⁴⁾。いずれの場合にも還元力の強い化合物を生ずることが薄層クロマトグラフィーによって確かめられ、反応液は 225 nm および 310 nm を中心に吸光度の変化が著しいことを示した。

しかしこの反応生成物を結晶状に得ることはむずかしくわずかにグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニンとTRとの縮合物が得られているにすぎなかった⁹⁰⁾⁹¹⁾。われわれも上記アミノ酸⁴⁵⁾のほか改良法によってトリプトファン⁴⁶⁾ (Fig. 19) やイソロイシン⁴⁷⁾、さらにアデニン、グアニン、シトシンなど⁴⁸⁾とも縮合したエナミノール化合物を結晶状に得ることに成功し、元素分析で確認したのち、還元力のほか、紫外、赤外、NMR、質量などの諸スペクトル、ポーログラム、融点、安定性など種々の特性を明らかにした。こうして TR-AA をモデルとして褐変、抗酸化能、生理的機能などの研究に利用することが可能になった。核酸切断能があることはすでに確かめられたが、この場合 DNA 切断は TR-AA の急速な酸化とともに短時間で起こり、エナミノールはアミノ酸を遊離してメソキサルジアルデヒドを生じることが認められた²⁵⁾。

レダクトン類の生理的機能が明らかになるにともない場合によってはこれを生体に投与してその機能を積極的に利用する可能性も考えられる。しかしこの場合には、レダクトン類が反応性の高い不安定な化合物であるのでなんらかの手段によって安定化することが望ましい。レダクトン類の反応性ならびに機能はいずれもエンジオー

Fig. 20. Reaction of TR with MTBO in the Presence of *n*-Propylamine.

Fig. 21. New syntheses of biologically important phosphate esters applying MTBO.

ルやエナミノールなどに基づいているので、このレダクトン構造をブロックし生体内で再生しうるものでなければならない。その目的に合致するものの一つとしてリン酸エステルが注目される。リン酸化剤は数多く知られているが、レダクトン類のような不安定な化合物のリン酸化には温和な条件で効率よく反応するリン酸化剤が要求される。われわれが開発した新リン酸化剤 MTBO はこの要求を最もよく満足するものであって^{92)~96)}、これにより TR-2-P を合成することができた (Fig. 20)²²⁾。この MTBO は 1 級または 2 級アミンの存在下で特異的なリン酸化剤となりうるものであって (i) リン酸化能が高く、(ii) リン酸化反応に際し除去しやすい *o*-ヒドロキシベンジル基を生じ、(iii) 酸化除去しうるメチルチオ基を有している。さらにメチルチオ基の除去に際し閉環反応を起こしうるので、ヌクレオシドから直接的にサイクリックヌクレオチドを合成しうるほか、Fig. 21 に示すような生化学的ならびに食品化学的に重要な種々のリン酸化合物を合成することができる。TR-2-P は Cu^{2+} 共存下でもきわめて安定であり、また還元力も TR の約 1/12 にすぎない。核酸切断能も非常に弱く Cu^{2+} 共存下でも単鎖切断が認められるのみであるが、生体内に広く

分布しているホスファターゼの基質となり、この作用によりリンを遊離してエンジオール構造を再生し核酸切断能を復活しうることは AsA-3-P の場合と同様である²⁷⁾。TR-2-P は 3 位に OH 基を保持している。したがってアミノ酸と縮合しうることが、吸収スペクトルやクロマトグラフィーによっても確認され、反応生成物はエンヒドリン試薬およびリン酸発色試薬に陽性であって、エナミノールリン酸エステルであることを示している²²⁾。TR-2-P はさらにカテコールアミンなどと縮合することも可能であって、分子中にエナミノールならびにエンジオール構造を持つレダクトンが得られた (Fig. 22)⁴⁸⁾。

2. 酵素的褐変

種々の果実、蔬菜などが酵素的に褐変することは古くから広く知られている。これはとくに *o*-ジフェノールが酵素的に酸化されてキノンを生じ、これが種々のアミノ化合物と共重合を起こしてメラノイジンを生じることによるといわれている。この反応過程は非酵素的褐変系アミノカルボニル反応によく似ており、*o*-ジフェノールはレダクトン、キノンはジカルボニル化合物に対応すると考えられる。しかし酵素的褐変に関しては、一般にこれまでおもに酵素 (ポリフェノールオキシダーゼ EC 1.10.3.1) の特性に研究の重点は指向されてきた。

われわれはリンゴ酵素による褐変における色素形成を主として分光学的に追及してきたが^{97)~104)}、酵素的褐変系においても抗酸化能¹⁰⁵⁾ ならびに還元力を生じ、しかもアミノ酸の添加により増強されることを認めた¹⁰⁶⁾。この還元力の本体は同定されていないがレダクトンであると推定され、しかもその形成がアミノ酸により増強されることからアミノレダクトンの可能性が大きい。Table 6 にカテコールを基質とした酵素的褐変系の褐変

Fig. 22. Reaction product of TR-2-P with dopamine.

Table 6. Reducing and antioxidative activities of the enzymatic browning system.

Browning system	Enzyme+Catechol		Enzyme+Catechol+methionine	
	Nondialysable	Dialysable	Nondialysable	Dialysable
Browning (OD _{blue})	0.590	0.150	0.400	0.600
Reducing activity (OD ₅₃₀)	0.420	0.050	0.442	0.290
Antioxidative activity (POV %)	9.2	17.9	8.8	8.3

Fig. 23. ESR spectra of non-dialysable melanoidin from enzyme-catechol system.

度、抗酸化力および還元力を示すが、いずれも非透析画分に強く3者はかなり密接な関係があると考えられる。しかし必ずしも並行関係にはない。たとえば還元力の生成は、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、スレオニン、バリン、アスパラギン、グリシン、セリンなど相当数のアミノ酸によって促進されるが、抗酸化力はメチオニンによってのみ増強された。しかもその効果は褐変系の透析性画分において認められ、また基質カテコールに対し1/2ないし2倍量の範囲において顕著であった¹⁰⁶⁾。

レダクトン類とくにエンジオール化合物には自動酸化にともないフリーラジカルを形成するものが知られている³⁵⁾。アミノカルボニル反応によって生成したメラノイジン中にもレダクトン構造が含まれており⁸⁹⁾、またフリーラジカルも検出されている¹⁰⁷⁾。われわれもカテコールやクロゲン酸など酵素的褐変基質の自動酸化にともなう ESR スペクトルを時間的に追及するとともに^{108)~110)}、メラノイジン中にも比較的安定なフリーラジカルが存在することを認めた¹¹¹⁾。その ESR スペクトルは Fig. 23 に示すように非酵素的褐変によるものに類似

Fig. 24. Structure of some reductones.

Fig. 25. Products from quinones and *N*-acetylcysteine.

し、 g 値は 2.004 ないし 2.007 であった。

上述のように酵素的褐変系において酵素が関与するのは基質ポリフェノールの酸化過程のみであってキノンを生じる。われわれもカテコールの酵素的褐変にともなう吸収スペクトルの変化を追及し反応初期にキノンの生成を認めた⁹⁹⁾。しかし生成したキノンは引き続きアミノ化合物と共重合を起こしてメラノイジンを生じ非酵素的褐変とかなり共通していると推定されているが、この反応過程はほとんど解明されていない。そこで反応モデルとしてキノンとアミノ酸との反応を *p*-ベンゾキノンを用いて試験した。キノンと各種アミノ酸との反応によって褐変が起こり、いずれのアミノ酸の場合にもその進行とともに還元能が著しく増加し、また抗酸化力も形成した¹¹²⁾。その効果はアミノ酸の種類により異なり、褐変はトリプトファンで最も顕著であり、アスパラギン酸、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン、アルギニンなども比較的有効であった。これに対して還元力はシステインによってとくに強く形成されたが他のアミノ酸では著しい差は認められなかった。一方、抗酸化力はシステインおよびヒスチジンによって強く発現し、チロシン、トリプトファン、アルギニンなどでもかなりの効果を示した。

そこで、つぎにそれらの性質が顕著にみられたヒスチジンおよびシステインとキノンとの反応系をとりあげた。その結果、ヒスチジンではアミノ基、システインではSH基を介してキノンの1,4位に付加し、相当するジフェノールとなって還元性の主体をなすことが示された¹¹³⁾。このジフェノールは構造上アミノレダクトンまたはチオールレダクトンに属し強い還元力をもつことが予想される。また、キノンと*N*-アセチルシステインとの褐変反応液からハイドロキノン-*N*-アセチルシステインおよびその酸化型キノン-*N*-アセチルシステインを結晶状に分離し、これら1,4付加物が褐変反応の中間体であることを確認した。とくにチオールエノール構造をもつハイドロキノン-*N*-アセチルシステインは非常に強い還元力(AsAの約1.5倍、ハイドロキノンの約3.3倍)をもつことがわかった¹¹³⁾。他のキノン、たとえば、生理学的止血作用を有し、またミトコンドリアの酸化リン酸化に必要な副成分としての機能をもつとされているメナジオン(2-メチル-1,4-ナフトキノン)からも*p*-ベンゾキノンの場合と同様に、*N*-アセチルシステインの置換体であるメナジオン-*N*-アセチルシステイン、およびハイドロキシメナジオン-*N*-アセチルシステインを結晶状に分離し、まったく同一の機構で褐変が進むことを認めた。ここで得られたハイドロキシメナジオン-*N*-アセチルシステインはさらに還元力の強いチオールレダクトンであって、AsAの約3倍、ハイドロキシメナジ

オンの約4.2倍、ハイドロキノン-*N*-アセチルシステインの約2倍に達した¹¹⁴⁾。

一方、こうして得られたキノン誘導体は対応するフリーのキノンにくらべて安定であり、しかも着色度はきわめて高いことから酵素的褐変系の重要な中間体であることは明らかであるが、さらにAsAはこれを容易に還元し、また酵素キノンレダクターゼもより高い活性を示し、無色のジフェノールに変換することによって効果的に褐変を抑制することを認めた¹¹⁵⁾。

以上は恩師 山藤一雄教授によって展開されてきた一連の研究に従事し、また主としてレダクトンの立場から継承続行してきたものであって、なんらかの進展が見られたとすれば筆者にとって何よりの喜びとするところである。この間、在職中はもちろん定年退官後の今日に至るまで終始ご懇篤なご指導、ご鞭撻を賜っている恩師に心から感謝申しあげる。また山藤教授を介してご高誼をいただいたレダクトン化学の創始者 故 H. v. Euler 教授、研究の進行にともない種々ご教示、ご援助をいただいた本学食糧化学工学科 野村男次教授、農芸化学科 江藤守総教授、佐賀大学農芸化学科 藤井実教授に深く御礼申しあげる。さらに、これらの研究は、村上浩紀、飯尾雅嘉、藤井高任、中村泰彦、篠原和毅、尊田民喜、飯山悟、畑中千秋、江藤正義、富田純史の諸博士をはじめ、当研究室における大学院学生、卒業論文学生および研究生諸君、ならびに曾 耀崑、朱 光枝、李 鎮夏、Maher Md. Tufail、呉 榮燦各留學生諸氏のご協力を得たものであって衷心から謝意を表したい。

本文中次の略字を用いた。

AsA : アスコルビン酸; DAsA : デヒドロアスコルビン酸; DKG : 2,3-ジケトグルコン酸; MDT : 5-メチル3,4-ジヒドロテトロン; TR : トリオースレダクトン; EA : エリソルビン酸; DEA : デヒドロエリソルビン酸; AsA-3-P : アスコルビン酸-3-リン酸; TR-2-P : トリオースレダクトン-2-リン酸; DAsA-OPD : デヒドロアスコルビン酸と *o*-フェニレンジアミンとの縮合物; 3-HK : 3-ヒドロキシキヌレン; 3-HAA : 3-ヒドロキシアントラニル酸; ScA : スコルバミン酸; MHC : メルカプトヒドロキシクマリン; MNNG : *N*-メチル-*N'*-ニトロ-*N*-ニトロソグアニジン; TR-AA : トリオースレダクトンとアミノ酸との縮合物(例 TR-Trp : トリオースレダクトンとトリプトファン); MTBO : 2-メチルチオ-4H-1,3,2-ベンゾジオキサホスホリン-2-オキシド(2-methylthio-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide)

文 献

- 1) レダクトン全般について 野村男次, 大村浩久: レダクトンの化学 (1969), 内田老鶴園新社 (東京)
- 2) Yamafuji, K.: Nutritional Factors in Virus Formation (1964), Crosby Lockwood & Son Ltd. London
- 3) Yamafuji, K.: *Enzymologia*, **27**, 217 (1964)
- 4) 山藤一雄: 東大応微研シンポジウム 第9集, 160 (1967)
- 5) 山藤一雄: 食物・癌・分化 (1970), 秀巧社 (福岡)
- 6) 山藤一雄編: 生命化学 (1974), 内田老鶴園新社 (東京)
- 7) Yamafuji, K. and Murakami, H.: *Enzymologia*, **35**, 139 (1968)
- 8) 村上浩紀, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **23**, 103 (1968)
- 9) 村上浩紀, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **24**, 13 (1969)
- 10) 村上浩紀, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **24**, 19 (1969)
- 11) Yamafuji, K., Murakami, H. and Shinozuka, M.: *Z. Krebsforsch.*, **73**, 195 (1970)
- 12) Murakami, H. and Yamafuji, K.: *Enzymologia*, **38**, 337 (1970)
- 13) 中村泰彦, 山藤一雄: 九大農学芸誌, **23**, 119 (1968)
- 14) 中村泰彦: 佐賀女短大紀要, **3**, 11 (1968)
- 15) Yamafuji, K., Nakamura, Y., Omura, H., Soeda, T. and Gyotoku, K.: *Z. Krebsforsch.*, **76**, 1 (1971)
- 16) 中村泰彦: 佐賀女短大紀要, **6**, 1 (1972)
- 17) Omura, H., Tomita, Y., Nakamura, Y. and Murakami, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **18**, 181 (1974)
- 18) 富田純史, 江藤正義, 飯尾雅嘉, 村上浩紀, 大村浩久: 九大農学芸誌, **28**, 131 (1974)
- 19) Tomita, Y., Fukumoto, Y., Shinohara, K. and Omura, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **19**, 139 (1975)
- 20) 大村浩久: ビタミン, **48**, 503 (1974)
- 21) Omura, H., Iiyama, S., Tomita, Y., Narazaki, Y., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **21**, 237 (1975)
- 22) 篠原和毅, 江藤正義, 曾 耀崑, 朱 光枝, 富田純史, 大村浩久: 農化誌, **49**, 223 (1975)
- 23) Studier, F. W.: *J. Mol. Biol.*, **11**, 373 (1965)
- 24) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Murakami, H.: *Enzymologia*, **42**, 439 (1972)
- 25) 篠原和毅, 福元裕二, 曾 耀崑, 井上 譲, 大村浩久: 農化誌, **48**, 499 (1974)
- 26) Omura, H., Tomita, Y., Iiyama, S. and Narazaki, Y.: Abst. Xth Internat. Cong. Nutrition, 1436 (1975); Nutrition, Proc. Xth Internat. Cong. Aug. 3-9, 1975, Kyoto, Japan, p. 560
- 27) 篠原和毅, 内野文弘, 江藤正義, 曾 耀崑, 大村浩久: 栄養と食糧, **30**, 230 (1977)
- 28) 飯山 悟, 村上浩紀, 久良木倫生, 大村浩久: 農化誌, **47**, 455 (1973)
- 29) 白畑実隆, 村上浩紀, 大村浩久: 九大農学芸誌, **29**, 1 (1974)
- 30) Shinohara, K., Omura, H., Fukumoto, Y., Torikai, Y. and Yamafuji, K.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **19**, 169 (1975)
- 31) 大村浩久, 富田純史, 篠原和毅, 村上浩紀: 未発表
- 32) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化誌, **49**, 401 (1975)
- 33) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化誌, **50**, 193 (1976)
- 34) 村上浩紀, 白畑実隆, 山田耕路, 大村浩久: 農化誌, **49**, 475 (1975)
- 35) Piette, L. H., Yamazaki, I. and Mason, H. S.: Free Radicals in Biological Systems (Blois, M. S. et al. ed.), 195 (1961), Academic Press, New York and London
- 36) 村田 晃: 蛋白質 核酸 酵素: **20**, 593 (1975)
- 37) Boyland, E. and Watson, G.: *Nature.*, **177**, 837 (1956)
- 38) 藤井高任: 学位論文 (九州大学農学部 1971)
- 39) Yamafuji, K., Fujii, T., Kanegae, Y. and Matsuo, Y.: *Enzymologia*, **43**, 73 (1972)
- 40) 藤井高任, 山藤一雄, 大村浩久: 栄養と食糧, **25**, 309 (1972)
- 41) 大村浩久, 藤田明男, 佐藤雅子, 大槻 実, 飯尾雅嘉: 九大農学芸誌, **28**, 79 (1974)
- 42) 篠原和毅, 曾 耀崑, 井上 譲, 佐藤雅子, 大村浩久: 九大農学芸誌, **28**, 139 (1974)
- 43) 篠原和毅, 曾 耀崑, 大村浩久: 九大農学芸誌, **29**, 15 (1974)
- 44) 篠原和毅, 曾 耀崑, 大村浩久: 九大農学芸誌, **29**, 23 (1974)
- 45) 大村浩久, 井上 譲, 江藤正義, 曾 耀崑, 篠原和毅: 九大農学芸誌, **29**, 61 (1974)
- 46) 篠原和毅, 曾 耀崑, 内野文弘, 大村浩久: 農化誌, **49**, 463 (1975)
- 47) 篠原和毅, 朱 光枝, 曾 耀崑, 村上浩紀, 大村浩久: 九大農学芸誌, **30**, 157 (1976)
- 48) 篠原和毅, 朱 光枝, 李 鎮夏, 村上浩紀, 大村浩久: 農化誌, **51**, 321 (1977)
- 49) 李 鎮夏, 篠原和毅, 村上浩紀, 大村浩久: 農化誌, **52**, 11 (1978)
- 50) Omura, H., Tomita, Y., Fujiki, H., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, to be published
- 51) Yamafuji, K., Shinohara, K., Yoshihara, F., Iio, M. and Torikai, Y.: *Enzymologia*, **40**, 107 (1971)
- 52) Yamafuji, K. and Hashinaga, F.: *Nature*, **210**, 1158 (1966)
- 53) Yamafuji, K., Hashinaga, F. and Fujii, T.: *Enzymologia*, **31**, 92 (1966)
- 54) Yamafuji, K. and Hashinaga, F.: *Enzymologia*, **32**, 364 (1967)
- 55) Omura, H. and Yamaguchi, K.: *Enzymologia*, **33**, 1 (1967)
- 56) Omura, H., Iiyama, S., Fujii, T. and Yamafuji, K.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, **17**, 181 (1973)
- 57) Yamafuji, K., Shinohara, K., Yoshihara, F., Omura, H. and Ogata, N.: *Enzymologia*, **41**, 183 (1971)
- 58) Yamafuji, K. and Uchida, Y.: *Nature*, **209**, 301 (1966)
- 59) Yamafuji, K. and Uchida, Y.: *Enzymologia*, **35**, 131 (1968)
- 60) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Omura, H.: *Enzymologia*, **43**, 113 (1972)
- 61) 大村浩久, 飯山 悟: 九大農学芸誌, **27**, 55 (1972)

- 62) 大村浩久, 篠原和毅, 塚本 徹, 鳥巢隆雄: 栄養と食糧: 23, 343 (1970)
- 63) 大村浩久, 井上義人, 佐藤雅子: 農化誌, 47, 591 (1973)
- 64) 飯尾雅嘉, 山藤一雄: 九大農学芸誌, 23, 113 (1968)
- 65) 飯尾雅嘉, 山藤一雄: 九大農学芸誌, 24, 25 (1969)
- 66) Yamafuji, K., Iio, M. and Eto, M.: *Z. Krebsforsch.*, 75, 55 (1970)
- 67) Yamafuji, K., Iio, M., Yoshihara, F. and Shinohara, K.: *Z. Krebsforsch.*, 75, 114 (1971)
- 68) Omura, H., Nakamura, Y., Tomita, Y. and Yamafuji, K.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 17, 187 (1973)
- 69) Omura, H., Tomita, Y., Murakami, H. and Nakamura, Y.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 18, 191 (1974)
- 70) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Shinohara, K.: *Enzymologia*, 40, 259 (1971)
- 71) Shinohara, K., Omura, H., Yoshihara, F. and Yamafuji, K.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 20, 117 (1976)
- 72) Yamafuji, K., Iiyama, S. and Omura, H.: *Enzymologia*, 42, 347 (1972)
- 73) Omura, H., Tomita, Y., Fujiki, H., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* to be published
- 74) 飯山 悟: 学位論文 (九州大学農学部 1974)
- 75) Omura, H., Tomita, Y., Fujiki, H., Shinohara, K. and Murakami, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* to be published
- 76) Szent-Györgyi, A.: *Bioelectronics* (1968), Academic Press (New York and London)
- 77) 飯尾雅嘉, 岡部公一, 大村浩久: 栄養と食糧, 28, 271 (1975)
- 78) Iio, M., Okabe, K. and Omura, H.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 22, 53 (1976)
- 79) Murakami, H., Miyoshi, T. and Omura, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 18, 149 (1974)
- 80) Murakami, H., Miyoshi, T., Koga, M., Yamada, K. and Omura, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 39, 795 (1975)
- 81) Omura, H. *et al.*: to be published
- 82) Iiyama, S., Omura, H., Murakami, H., Narazaki, Y. and Yamafuji, K.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 21, 181 (1977)
- 83) 高宮和彦, 津田淑江: 日本栄養食糧学会第 27 回総会発表 (1973)
- 84) Cameron, E. and Pauling, L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 3685 (1976)
- 85) 山藤一雄: 九大農製報, 4, 8 (1951)
- 86) Stich, H. F., Karim, J., Koropatnik, J. and Lo, L.: *Nature*, 260, 722 (1976)
- 87) Omura, H., Shinohara, K., Maeda, H., Nomura, M. and Murakami, H.: to be published
- 88) Kirigaya, N., Kato, H. and Fujimaki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 32, 287 (1968)
- 89) Kato, H., Noguchi, G. and Fujimaki, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 32, 916 (1968)
- 90) Euler, H., Hasselquist, H. and Nomura, D.: *Ark. Kemi.*, 15, 283 (1960)
- 91) 小幡 斉, 徳山 泰: 日化, 92, 566 (1965)
- 92) Iio, M., Eto, M. and Omura, H.: *Agric. Biol. Chem.*, 37, 115 (1973)
- 93) Eto, M., Iio, M., Kobayashi, Y., Omura, H. and Eto, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 38, 2081 (1974)
- 94) Iio, M., Kobayashi, Y., Eto, M., Yano, K., Omura, H. and Eto, M.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 19, 73 (1975)
- 95) Eto, M., Ito, M., Omura, H. and Eto, M.: *Nucleic Acids Research, Sp. Publ.*, 2, 65 (1976)
- 96) Iio, M., Yano, K., Eto, M., Omura, H. and Eto, M.: *Agric. Biol. Chem.*, 41, 155 (1977)
- 97) 大村浩久, 内田 泰, 尊田民喜: 九大農学芸誌, 23, 33 (1976)
- 98) 大村浩久, 尊田民喜: 栄養と食糧, 22, 497 (1969)
- 99) 大村浩久, 尊田民喜: 栄養と食糧, 23, 367 (1970)
- 100) 大村浩久, 尊田民喜, 井上浩輔: 栄養と食糧, 24, 242 (1971)
- 101) 尊田民喜, 井上浩輔, 荒巻輝代, 大村浩久: 九大農学芸誌, 28, 73 (1974)
- 102) 尊田民喜, 大村浩久: 栄養と食糧, 26, 531 (1973)
- 103) 尊田民喜, 稲富良文, 浅田要一郎, 吉川秀樹, 大村浩久: 九大農学芸誌, 29, 71 (1974)
- 104) 尊田民喜, 荒巻輝代, 大村浩久: 栄養と食糧, 28, 151 (1975)
- 105) 大村浩久, 尊田民喜, 浅田要一郎, 稲富良文, 橘英文: 食工誌, 22, 387 (1975)
- 106) 大村浩久, 尊田民喜, 浅田要一郎, 村中 誠, 橘英文: 食工誌, 22, 395 (1975)
- 107) Mitsuda, H., Yasumoto, K. and Yokoyama, K.: *Agric. Biol. Chem.*, 29, 751 (1965)
- 108) 尊田民喜, 浅田要一郎, 稲富良文, 大村浩久: 九大農学芸誌, 30, 109 (1975)
- 109) 尊田民喜, 大村浩久: 栄養と食糧, 28, 463 (1975)
- 110) 尊田民喜, 大村浩久: 栄養と食糧, 30, 55 (1977)
- 111) 尊田民喜, 村中 誠, 大村浩久: 栄養と食糧, 28, 387 (1975)
- 112) 畑中千秋, 大村浩久: 栄養と食糧, 26, 457 (1973)
- 113) 畑中千秋, 大村浩久, 野村男次: 農化誌, 46, 341 (1972)
- 114) 畑中千秋, 野村男次, 大村浩久: 農化誌, 46, 525 (1972)
- 115) Nomura, D., Hatanaka, C. and Omura, H.: *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.*, 17, 313 (1973)

(昭和 52 年 9 月 12 日受理)