総 説

食飼料中の特殊なアミノ酸類に関する食品生化学的研究†

佐々岡 啓

徳島大学医学部栄養学科

Biochemical Studies on Unusual Amino Acids in Food and Feed

Kei SASAOKA

Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima, 770

食飼料は複雑多様な成分よりなる高度の複合系であり、その構成成分を正確に認識・把握することは食品化学上必須の研究課題である。

著者らはかかる観点に立って、従来より食飼料において新しく発見されたアミノ酸およびアミノ酸関連化合物（これらを本稿において特殊なアミノ酸類とよぶ）を中心に研究を遂行してきたが、現在は下記の3種類の研究を行なっている。

1. 食用キノコ中の特殊なアミノ酸類に関する研究

今日、キノコは栽培技術の進歩などにより日常食品の一つとなっているが、その構成成分に関する知識は乏しいのが現状である。たとえば、*Agaricus bisporus* は通称マッシュルームとして世界的に広く愛好されている栽培キノコであるが、この代表的な食用キノコにおいてすら *N*-(γ -L-glutamyl)-4-hydroxyaniline¹⁾ (GHA) や agaritine²⁾ (フェニルヒドラジン誘導体) などの特殊な芳香族化合物が相当量存在しているがこれらに対する認識は不十分である。なお、*A. bisporus* を本稿においてはマッシュルームとよぶ。

著者らはこれら化合物の系統的な生理・生化学的特徴づけを行なうことを計画し、まずマッシュルームにおけるこれら芳香族化合物の前駆体として最も妥当であると考えられる放射性シキミ酸を与えてその取り込みの様相を解析した³⁾。

可食期の子実体 (stage 2⁴⁾) に [U - 14 C] シキミ酸 (10 μ Ci/fruitlet body) を与え、24 時間後に菌柄と菌傘とに分ち、それぞれを 75% エタノールで抽出し、濃縮

後 Sephadex G-10 により放射性代謝物を分画したのが Fig.1 である。Fig.1 には菌柄についての例を示したが、菌傘についても同様なクロマトグラムを得た。

図において Peak 4 の主体は未代謝のシキミ酸である。Peak 5 はフェニルアラニンと未同定の放射性化合物に、また Peak 6 はチロシンに由来する。最も取り込みの顕著な Peak 8 には単一の放射性代謝物が存在するが、これをクロマトグラフ法により純化した。本物質は加水分解により等モルの L-グルタミン酸と 4-hydroxyaniline (HA) を与える。ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS) などにより、本物質を上記した GHA と同定した。ここに生成した GHA において、放射能は HA 部に局在していた。なお、Fig.1 において菌柄試料中の放射能の約 50% は GHA に存在していた。また Peak 7 は L-3,4-dihydroxyphenylalanine に、Peak 9 は *N*-(γ -L-glutamyl)-3,4-dihydroxyaniline (GDA) に由来する⁵⁾。

上記の結果は、マッシュルームにおいて、芳香族アミノ酸や芳香族系ビタミンなどの生合成系として重視されているシキミ酸経路⁶⁾ が活発に作動しており、しかもシキミ酸がきわめて効率よく GHA の HA 部に選択的に取り込まれることを示すものである。

この新事実に基づき、HA 生合成反応のシキミ酸経路における位置づけを行なった⁷⁾。

まず、[U - 14 C] および [3 - 3 H] シキミ酸を同時に子実体に与え、生成した放射性 GHA を結晶として単離した。 3 H および 14 C は前述したごとく GHA の HA 部に選択的に取り込まれていた。この場合、培養に用いたシキミ酸中の 3 H と 14 C の比は 1:0.82 であったのに対し、HA におけるそれは 1:0.74 であった。このことは、[U - 14 C] シキミ酸のカルボキシル基は HA 生成

† 本総説は昭和 59 年度学会賞の受賞対象となったものである。

〒770 徳島市蔵本町 3

Fig. 1. Elution pattern of radioactive metabolites.

The sample solution corresponding to one-half of one stipe was subjected to gel filtration on a Sephadex G-10 column and the compounds were eluted with water.

Fig. 2. Degradation of 4-hydroxyaniline.

The reactions used: (a), acetylation with acetic anhydride⁹; (b), nitration⁹; (c), hypobromite degradation¹⁰; (d), reduction with a Fe-HCl system¹⁰; (e), condensation with phthalic anhydride¹¹; (f), acetylation with acetic anhydride¹²; (g), diazotization¹³; (h), reduction with NaBH₄¹³; (i), alkylation with isobutanol¹⁴; (j), oxidation with KMnO₄¹⁴; (k), condensation with 2,4-dinitrophenylhydrazine¹⁴; (l), oxidation with V₂O₅¹⁵; (m), condensation with 1,3-butadiene and oxidation with Na₂Cr₂O₇¹⁵; (n), oxidation with KMnO₄¹⁵; (o), decarboxylation with a Cu-quinoline system.¹⁶ The compounds written in Roman numerals: I, Shikimic acid; II, GHA; III, HA; IV, *N*-Acetyl-4-hydroxyaniline; V, 3,5-Dinitro-*N*-acetyl-4-hydroxyaniline; VI, Bromopicrin; VII, Methylamine; VIII, *N*-Methylphthalimide; IX, *N*,*O*-Diacetyl-4-hydroxyaniline; X, 2,6-Dinitro-*N*,*O*-diacetyl-4-hydroxyaniline; XI, 4-Hydroxybenzene diazonium borofluoride; XII, Phenol; XIII, 4-*tert*-Butylphenol; XIV, Trimethylpyruvic acid; XV, 2,4-Dinitrophenylhydrazone of trimethylpyruvic acid; XVI, 1,4-Benzoquinone; XVII, 1,4-Naphthoquinone; XVIII, Phthalic acid; XIX, Barium carbonate.

Table 1. Localization of the tritium atom in 4-hydroxyaniline derived from [3-³H]shikimic acid.

Compound	Specific activity (mCi/mol)	Relative activity (%)
GHA (II)	31.09	—
HA (III)	30.10	100
<i>N</i> -Acetyl-4-hydroxyaniline (IV)	29.79	99.0
3,5-Dinitro- <i>N</i> -acetyl-4-hydroxyaniline (V)	29.83	99.1
<i>N</i> , <i>O</i> -Diacetyl-4-hydroxyaniline (IX)	29.09	96.6
2,6-Dinitro- <i>N</i> , <i>O</i> -diacetyl-4-hydroxyaniline (X)	0.40	1.3

The Roman numerals used in Fig.2 are written in the parentheses.

Relative activity=(the specific activity of the products/the specific activity of HA)×100.

に際して脱離するが、[3-³H] シキミ酸の ³H はそのまま保持されることを示すものである。

次に、[3-³H] シキミ酸のみを取り込ませて、HA における ³H の分布を検討した。Fig.2 の Procedure A において生成した 3,5-dinitro-*N*-acetyl-4-hydroxyaniline (Compound V) は ³H を保持していたが、Procedure B により生成した 2,6-dinitro-*N*,*O*-diacetyl-4-hydroxyaniline (Compound X) は非放射性であった (Table 1)。すなわち、HA 中の ³H は、その C-2, C-6 のニトロ化により脱離する。この結果は、³H は HA のアミノ基のオルト位に存在すること、換言すれば、シキミ酸のアミノ化はその C-2 または C-4 で起こることを示すものである。

Possibility

- The 1st. C-1 and C-2 or C-1 and C-6
 The 2nd. C-2 and C-3 or C-5 and C-6
 The 3rd. C-3 and C-4 or C-4 and C-5

Fig.3. Possibilities as to the distribution of the ¹⁴C atoms in 4-hydroxyaniline derived from [1,6-¹⁴C]shikimic acid.

Table 2. Degradation experiments of 4-hydroxyaniline derived from [1,6-¹⁴C]shikimic acid.

Compound	Specific activity (mCi/mol)	Relative activity (%)
GHA (II)	22.04	—
HA (III)	21.20	100
2,4-Dinitrophenylhydrazone of trimethylpyruvic acid (XV)	0.42	2.0 ^{a)}
3,5-Dinitro- <i>N</i> -acetyl-4-hydroxyaniline (V)	20.28	95.7
<i>N</i> -Methylphthalimide (VIII) ^{b)}	4.96	23.4
2,6-Dinitro- <i>N</i> , <i>O</i> -diacetyl-4-hydroxyaniline (X)	20.82	98.2
<i>N</i> -Methylphthalimide (VIII) ^{c)}	0.04	0.2
1,4-Naphthoquinone (XVII)	19.87	93.7
Phthalic acid (XVIII)	15.26	72.0
BaCO ₃ (XIX)	4.93	23.3

The Roman numerals used in Fig.2 are written in the parentheses.

Relative activity=(specific activity of the products/the specific activity of 4-hydroxyaniline)×100.

^{a)} Alkylation at either C-3 or C-5 of HA by isobutanol occurred in a slight degree, and a small amount of 2,4-dinitrophenylhydrazone of trimethylpyruvic acid derived from trimethylpyruvic acid containing either C-3 or C-5 of 4-hydroxyaniline was formed.¹⁶⁾

^{b)} *N*-Methylphthalimide obtained from 3,5-dinitro-*N*-acetyl-4-hydroxyaniline in Degradation procedure A in Fig.2.

^{c)} *N*-Methylphthalimide obtained from 2,6-dinitro-*N*,*O*-diacetyl-4-hydroxyaniline in Degradation procedure B in Fig.2.

さらに, $[1, 6-^{14}\text{C}]$ シキミ酸を取り込ませて HA における ^{14}C の分布を検討した。

シキミ酸の $1, 6-^{14}\text{C}$ の HA における分布の仕方は, HA 分子の対称性のゆえに Fig. 3 に示した三つの可能性が存在する。この可能性を Fig. 2 の化学分解により検討した。

Fig. 2 の Procedure C において, HA の C-1 および C-2 または C-1 および C-6 を含有する trimethyl-pyruvic acid (Compound XIV) の 2, 4-dinitrophenyl-hydrazone (Compound XV) は非放射性であった (Table 2)。ゆえに第 1 の可能性は否定される。

Procedure A において, HA の C-3 または C-5 に放射能が存在すれば, 3, 5-dinitro-*N*-acetyl-4-hydroxy-

aniline (Compound V) は hypobromite degradation (Reaction c) により等モルの放射性および非放射性の bromopicrin (Compound VI) を与え, それより誘導される *N*-methylphthalimide (Compound VIII) は HA の 1/4 の比放射能を有することが期待される。Table 2 に示したごとくこの期待値を得た。

Procedure B において, 2, 6-dinitro-*N*, *O*-diacetyl-4-hydroxyaniline (Compound X) より得た *N*-methylphthalimide (Compound VIII) には放射能は存在しなかった (Table 2)。このことは HA の C-2 および C-6 は非放射性であることを示すものであり, ゆえに第 2 の可能性もありえない。この事実は, 上記の Procedure C の結果をも裏づけるものである。

Table 3. Free amino acids and their derivatives in the fruiting bodies of *A. bisporus*.

Compound	Amount ($\mu\text{mol/g}$ fruiting bodies)	Compound	Amount ($\mu\text{mol/g}$ fruiting bodies)
Group I		Cystine	0.24
Phosphoserine	0.08	Cystathionine	0.63
Phosphoethanolamine	0.10	Methionine	0.40
Urea	3.30	Isoleucine	2.79
γ -L-Glutamylglycine	0.05	Leucine	3.59
Aspartic acid	2.10	β -Alanine	0.30
Methionine sulfoxide	0.32	γ -Aminobutyric acid	3.52
4-Hydroxyproline	0.18	Kynurenine	0.45
Threonine	3.64	Ornithine	7.33
Serine	2.73	Lysine	2.27
<i>N</i> -(γ -L-Glutamyl)ethanolamine	0.50	Ethanolamine	0.57
Asparagine	5.83	Ammonia	16.89
Glutamic acid	12.67	Histidine	3.49
Glutamine	4.25	3-Methylhistidine	0.05
Sarcosine	0.05	Arginine	8.68
α -Aminoadipic acid	0.52	Group II	
Proline	10.06	Agaritine ^{a)}	1.04
Glycine	2.24	3, 4-Dihydroxyphenylalanine	0.06
Alanine	12.72	Tyrosine	0.31
Citrulline	0.12	GDA	0.18
α -Amino- <i>n</i> -butyric acid	0.32	Phenylalanine	0.29
Valine	3.34	GHA	4.49
Saccharopine	0.37	Tryptophan ^{b)}	0.06

The compounds in Group I were determined by the amino acid analyzer (System I; Yanaco LC-5S, SCX1001 resin, lithium citrate buffer²²⁾). The F-I and F-II fractions were used for the analyses. Those in Group II except for tryptophan were determined as described in the text and Fig. 4.

^{a)} The decomposition of agaritine during the extration was estimated to be $10.7 \pm 2.6\%$ (mean $\pm$ S.D., $n=3$). This value was used for the correction.

^{b)} Tryptophan was determined fluorometrically²³⁾ after separation by gel filtration on a Sephadex G-10 column.³⁾

Procedure Dにおいて、1,4-naphthoquinone (Compound XVII) より誘導した phthalic acid (Compound XVIII) は HA の 3/4 の比放射能を示した (Table 2)。この結果は $[1,6-^{14}\text{C}]$ シキミ酸の一つの ^{14}C が HA の C-2, C-3, C-5 または C-6 のいずれかに存在し、phthalic acid の生成に際して失われることを意味している。phthalic acid より得た BaCO_3 (Compound XIX) の比放射能 (Table 2) は $[1,6-^{14}\text{C}]$ シキミ酸のもう一つの ^{14}C は HA の C-1 または C-4 に存在することを示している。上述したごとく Procedure B および C により、C-1, C-2 ならびに C-6 は非放射性であることは明らかである。これらの結果により第3の可能性が妥当であり、 $[1,6-^{14}\text{C}]$ シキミ酸の放射能は HA の C-3—C-4 または C-4—C-5 に存在すると結論される。

さて、上記の $[3-^3\text{H}]$ シキミ酸を用いた実験において、アミノ化はシキミ酸の C-2 または C-4 で起こることを示したが、アミノ基がシキミ酸の C-2 に結合した場合には、 $[1,6-^{14}\text{C}]$ シキミ酸の C-1 の放射能は、HA の C-2 または C-6 に存在することになるが、これは上述の Procedure B および C の実験で否定されている。ゆえに、シキミ酸の HA への生化学的転換に際してアミノ化はシキミ酸の C-4 で起こることは明白である。

ここに得たアミノ化がシキミ酸の C-4 で起こるという結果は、HA が葉酸の構成因子である α -アミノ安息香酸¹⁷⁾ (PABA) およびクロラムフェニコール生合成の中間体である α -アミノフェニアラニン¹⁸⁾ と同様な反応により合成されることを示すものであり、現在 PABA より HA を生成する新しい反応を見だしている。

上述の研究に関連して、マッシュルームの遊離アミノ酸組成はきわめて複雑であるので下記のごとき系統的な分画法を確立して、そのアミノ酸パターンを詳細に検討した^{19)~21)}。

可食期の子実体含水エタノールで抽出後、常法により Amberlite IR-120B カラムを用いてアミノ酸画分を調製した。

ここに得たアミノ酸画分を Dowex 1×4 カラムにより、カラムに吸着されず水洗で流出する F-I 画分と、3N 酢酸で溶出される F-II 画分に分かった。F-I 画分はさらに Dowex 50 W×4 カラムを用いて F-III~F-XI 画分に細分画した。

上記のごとくにして調製した試料について分析した結果を Table 3 に示した。

表において Group I のアミノ酸の測定は主として F-I および F-II 画分を用いて行なったが、場合によっては上記の各画分より当該物質を単離してより精密な分析に供した。同定にはアミノ酸分析計のほか二次元ペーパークロマトグラフィー、化学分解、各種機器分析など

を併用して正確を期した。

また、上述したマッシュルーム中の特殊な芳香族化合物をアミノ酸分析計 (Yanaco LC-5S) により統一的に測定する方法を開発した。本測定に使用した resin/buffer 系は次のごとくである: System II, Aminex A-4/0.5 N sodium citrate buffer (pH 3.8), 2.5% *n*-propanol; System III, Aminex A-4/0.5 N sodium citrate buffer (pH 4.45)。本法による分析例を Fig. 4 に示した。Table 3 の Group II は本法により定量した値である。

Table 3 に示したごとく、可食期の子実体において

Fig. 4. Chromatograms of the aromatic compounds in the fruiting bodies of *A. bisporus*.

The extract with 75% ethanol containing 1% ascorbic acid and 0.02 N HCl was chromatographed by the amino acid analyzer (Systems II and III described in the text). The color values of the aromatic compounds relative to norleucine (100) were as follows: agaritine, 85.0; 3,4-dihydroxyphenylalanine, 93.5; tyrosine, 94.3; GDA, 86.2; phenylalanine, 98.7; GHA, 87.2. As shown in Fig. 4A, the elution position of GDA coincided with that of tyrosine, while phenylalanine was able to be separated from the other compounds. And, in Fig. 4B, GDA overlapped with phenylalanine. Therefore, GDA was calculated by subtracting the value for phenylalanine obtained in Fig. 4A from the value for phenylalanine-GDA obtained in Fig. 4B.

A, Chromatogram with System II; B, Chromatogram with System III; 1, Agaritine; 2, 3,4-Dihydroxyphenylalanine; 3, Tyrosine; 4, GDA; 5, Phenylalanine; 6, GHA; IS, Internal standard (norleucine).

Table 4. Distribution of *N*-(γ -L-glutamyl)-4-hydroxyaniline and tyrosine in the fruiting bodies of *A. bisporus*.

Part	Average weight	GHA	Tyrosine
		Amount(μ mol/g fruiting bodies)	
Whole fruiting body	5.65 $\pm$ 0.81 ^{a)}	4.24 $\pm$ 1.15	0.27 $\pm$ 0.07
Cap	2.41 $\pm$ 0.29	1.44 $\pm$ 0.57	0.32 $\pm$ 0.09
Stipe	1.96 $\pm$ 0.47	4.17 $\pm$ 0.92	0.20 $\pm$ 0.09
Gill	1.28 $\pm$ 0.15	9.61 $\pm$ 1.75	0.28 $\pm$ 0.01

^{a)} The fruiting bodies were analyzed individually and the values were shown as the means $\pm$ S.D. ($n=3$).

44 種のニンヒドリン陽性化合物を検出した。

表を通観すると、上記の芳香族化合物のほかに代謝的にグルタミン酸と関連の深いアミノ酸が相当量存在すること、およびリジン代謝に関係する α -アミノアジピン酸、サッカロビンの存在などが特徴的である。

また Table 3 の Group II, すなわち芳香族化合物のうち GHA の存在がとくに目立っているが可食期の子実体の各部位における GHA とチロシンの量を Fig. 4 に示した方法により測定したのが Table 4 である。表に示したごとく、GHA は子実体各部位においてチロシンよりもはるか多量存在している。酵素的褐変がマッシュルームの品質を損なうことは周知のところであるが、GHA は新しいタイプのモノフェノールであり、この結果を踏まえてマッシュルームの酵素的褐変を吟味する必要がある。

さらに、上記の研究で確立した方法を他の食用キノコに適用し、たとえばヒラタケにおいて *N*³-acetyl-L-ornithine などの存在を示した²⁴⁾。

また、シメジ属の栽培キノコ、シロタモギタケにおいて未同定のニンヒドリン陽性化合物の存在を認め、そのクロマトグラフの挙動、GC-MS, ¹H および ¹³C 核磁気共鳴などにより、これを 2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acid (I) と同定した²⁵⁾。

本化合物の C-2 および C-3 は不斉炭素原子であり、ゆえに D_s-erythro- (Ia), L_s-erythro- (Ib), D_s-threo- (Ic) および L_s-threo-I (Id) の四つの光学異性体が存在する。これら四つの異性体は著者らの考案した方法により下記のごとく容易に識別しうる。

すなわち、I は Fig. 5 に示した化学分解²⁶⁾ によりグリセリン酸 (II) とホモセリン (III) となる。この場合 I の四つの異性体は次の生成物を与える: Ia, D_g-II-D_s-III; Ib, L_g-II-L_s-III; Ic, L_g-II-D_s-III; Id, D_g-II-L_s-III (D_g, L_g, D_s, L_s, Fischer の投影法)。生成物 II の光学的性質は D_g-glycerate dehydrogenase [EC 1.1.1.29] を用いる Kitagawa ら²⁷⁾ の方法により、ま

Fig. 5. Chemical degradation.

I, 2-Amino-3,4-dihydroxybutanoic acid; II, Glyceric acid; III, Homoserine.

Table 5. Optical properties of the degradation products of the isolated compound.

Product	Optical property	Ratio to the theoretical value (%) ^{a)}
II	D _g	95.4 ^{b)}
III	D _s	94.5

^{a)} Ratio to the amounts of the product used for the measurement.

^{b)} Values are means of duplicate determinations.

た III のそれは後記のシスタチオニンの光学異性体の項で例示する当該アミノ酸より L_s-leucyl peptide を合成し、生じた diastereoisomeric dipeptide をクロマトグラフ的に分画する Manning ら²⁸⁾ の方法により決定しうる。

シロタモギタケより単離した I の分解生成物は Table 5 に示したごとく II は D_g であり、III は D_s であった。ゆえに本キノコより得た I は D_s-erythro 型 (Ia) である。このことは、さらに、基準 Ia との比旋光度の比較および単離標品を直接 L_s-leucyl peptide として上記の Manning らの方法により確認した。

上記の研究により、シロタモギタケの未同定アミノ酸を D_s-erythro-2-amino-3,4-dihydroxybutanoic acid と決定した。本物質はシロタモギタケ中に比較的多量 (ca.

1 mg/g fruiting body) 含有されているが、天然におけるその存在を示したのは本研究が最初である。なお、著者らの現在研究に常用している上述のマッシュルームの子実体の細胞壁に 2-amino-2-deoxy-D_g-erythrose の存在が報告³⁰⁾されているが本物質は Ia のアルデヒドに相当する興味ある化合物である。

2. 植物性食品素材中の D-アミノ酸に関する研究

著者らは植物性食品素材中の特殊なアミノ酸類を検索している過程において、高等植物中に広く D-アミノ酸が存在することを発見した。これは従来の既成概念を破るものであり、以来その生化学的研究を遂行してきた^{30)~37)}。

さて、著者らはすでにエンドウの発芽時に、*N*-malonyl-D-alanine³¹⁾および γ -L-glutamyl-D-alanine³²⁾ (γ -Glu-p-Ala) が多量生成することを立証しているが、最近、エンドウ幼植物に各種放射性アミノ酸を与えて結合型 D-アミノ酸生成の様相を検討した³⁸⁾。

供試したアミノ酸は、D-[U-¹⁴C] アラニン、D, L-[3-¹⁴C]- α -アミノ-*n*-酪酸、D, L-[4-¹⁴C] バリン、D, L-[1-¹⁴C] ロイシンであるが、これらより生成した D-アミノ酸の γ -L-glutamyl peptide は γ -Glu-D-Ala が圧倒的であり γ -L-glutamyl-D- α -amino-*n*-butyric acid がこれに次ぎその生成量は γ -Glu-D-Ala の約 1/5 であった。D-バリンおよび D-ロイシンの γ -L-glutamyl peptide の生成量は微量であり、それぞれ γ -Glu-D-Ala の約 1/50 および 1/250 にすぎなかった。

これに対して、D-アミノ酸の *N*-マロニル化合物は供試した全アミノ酸より同程度に生成した。

以上の結果はエンドウ幼植物中に存在する 2 種の結合型 D-アミノ酸生成反応のうち、 γ -グルタミル化反応は

D-アラニンに特異性が高く、*N*-マロニル化反応は D-アミノ酸に対して特異性が広いことを示すものである。なお、D-アラニンの γ -グルタミル化反応の活性はその *N*-マロニル化反応よりもはるかに大であった。

ゆえに、エンドウ幼植物中の γ -Glu-D-Ala 生成反応の検索を行ない、L-グルタミンと D-アラニンより γ -Glu-D-Ala を合成する新規な酵素を発見し、この酵素を Table 6 に示したごとく約 600 倍に精製してその諸性質を検討した³⁹⁾。なお、本酵素は後述するごとく γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide 水解能を有するゆえ、Table 6 はその水解能で表示した。

Table 6 の Step VI の酵素標品を用いて L-グルタミンと D-[U-¹⁴C] アラニンを反応させ、その生成物を検討したのが Fig. 6 である。

図において、Peak 3 および 5 はそれぞれ未反応の L-グルタミンおよび D-[U-¹⁴C] アラニンである。Peak 2 の溶出位置は基準 γ -Glu-D-Ala のそれと一致する。この放射性化合物を単離し、その構造を解析した。

本物質は加水分解により等モルのグルタミン酸とアラニンを与え、放射能はアラニンに局在していた。それぞれの L-leucyl peptide を調製し、上述の Manning ら³⁸⁾の方法により両者の光学的性質を検討したが、グルタミン酸は L 型であり、アラニンは D 型であった。アラニンが D 型であることは D-amino acid oxidase-lactate dehydrogenase 系³¹⁾によっても確認した。さらに、単離標品のクロマトグラフ的挙動、その他の諸性質は基準 γ -Glu-D-Ala のそれと完全に一致した。ゆえに Peak 2 は γ -Glu-D-Ala であることは明らかである。

なお、Fig. 6 において Peak 1 は γ -L-glutamyl-L-glutamine であり、Peak 4 は L-グルタミン酸であるがこれについては後述する。

Table 6. Purification of γ -glutamyltransferase from pea seedlings.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (units) ($\times 10^3$)	Specific activity (units/mg protein) ($\times 10^3$)	Yield (%)
Crude homogenate	8,819	3,396	0.4	100
I. (NH ₄) ₂ SO ₄ (50-80% satn.)	1,366	2,650	1.9	78
II. Acid treatment	179	2,133	11.9	63
III. QAE-Sephadex	63	1,900	30.2	56
IV. Sephadex G-100	37	1,217	32.9	36
V. CM-cellulose	15	1,017	67.8	30
VI. Isoelectrofocusing	1.7	417	245.3	12

Crude homogenate was prepared from 500 g decotyledonized pea seedlings. The enzyme activity was measured by the hydrolysis of γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide. One unit of the activity was defined as the amount of the enzyme catalyzing the hydrolysis of 1 μ mol of γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide per min at pH 8.5.

上記の結果は、本酵素反応において L-グルタミンの γ -グルタミル基が次式のごとく D-アラニンへ転移することを示すものである。

Reaction I

本反応の γ -グルタミル基受容体を Table 7 に示した。表に示したごとく、D-アラニンが最も良好な受容体であり、D-フェニルアラニン、D- α -アミノ-n-酪酸がこれに次いだ。D-グルタミン酸、D-アスパラギン酸、D-セリン、D-プロリンなどは受容体とならなかった。

Table 8 に本反応の γ -グルタミル基の供与体につき検討した結果を示した。後記する従来一般に知られてい

Fig. 6. Chromatographic analysis of the reaction products.

The reaction was carried out 80 μg of the enzyme preparation (Step VI), 10 mM L-glutamine and 20 mM D- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ alanine (0.05 Ci/mol) at pH 9.0 for 2 hr. The reaction was stopped by addition of diluted HCl and one-half of the solution was directly chromatographed by the amino acid analyzer.³⁸⁾ The radioactivity was measured after fractionation of the effluent into 3 ml fractions. 1, γ -L-Glutamyl-L-glutamine; 2, γ -Glu-D-al; 3, L-Glutamine; 4, L-Glutamic acid; 5, D- $[U\text{-}^{14}\text{C}]$ Alanine.

る γ -glutamyltransferase の代表的な γ -グルタミル基の供与体であるグルタチオンは L-グルタミンの約 1/3

Table 7. Acceptor specificity of the transfer reactions assayed with L-glutamine as the γ -glutamyl donor.

Acceptor	Relative activity (%)
Reaction I	
D-Alanine	100
D- α -Amino-n-butyric acid	28
D-Valine	<1
D-Leucine	0
D-Phenylalanine	30
Reaction II	
L-Alanine	12
L- α -Amino-n-butyric acid	23
L-Valine	81
L-Leucine	233
L-Phenylalanine	430
L-Glutamine	91
Glycine	321
Glycylglycine	326
β -Alanine	218
γ -Aminobutyric acid	356
Ethylamine	29
Ethanolamine	121
Hydroxylamine ^{a)}	419

Reactions were carried out with the enzyme preparation (45 μg of protein, Step VI), 10 mM L-glutamine and 20 mM acceptors at pH 9.0 for 2 hr. The activities are expressed as relative values to the formation of γ -Glu-D-Ala.

^{a)} 200 mM hydroxylamine.

Table 8. Formation of γ -glutamyl peptides from various γ -glutamyl donors.

Donor	γ -Glutamyl peptide formed (nmol)		
	Reaction I	Reaction II	
	Assayed with D-alanine as the acceptor	Assayed with L-alanine as the acceptor	Assayed with L-leucine as the acceptor
L-Glutamine ^{a)}	135 (100)	16 (12)	311 (230)
Glutathione (reduced)	51 (37)	32 (24)	379 (281)
γ -L-Glutamylethylester	137 (101)	26 (19)	417 (307)

Reactions were carried out with the enzyme preparation (45 μg of protein, Step VI), 10 mM donors and 20 mM acceptors at pH 9.0 for 2 hr. The values in the parentheses are expressed as relative activities to the formation of γ -Glu-D-Ala from L-glutamine and D-alanine.

^{a)} D-Glutamine did not serve as a γ -glutamyl donor.

の活性を示すにすぎなかった。一方、合成基質である γ -L-glutamylethylester は L-グルタミンと同様に有効であった。D-グルタミンは供与体となりえなかった。

上記した L-グルタミンよりその γ -グルタミル基を D-アミノ酸に転移する反応は下記の既知の γ -glutamyltransferase には見られない特殊な反応である。なお、*Bacillus subtilis* などの D-glutamyltransferase [EC 2.3.2.1] ともちろんその基質特異性において異なっている。

なお、本酵素反応の至適 pH は 9.5 であり、L-グルタミンおよび D-アラニンに対する K_m は、それぞれ 2.1 ならびに 2.9 mM であった。

ここに得た酵素標品は上記の Reaction I のほかに、下記の従来一般に知られている γ -glutamyltransferase [EC 2.3.2.2] (本稿では便宜上 γ -GTP-2322 とよぶ) および agaritine γ -glutamyltransferase [EC 2.3.2.9] に類似した下記の反応を行なう。

(X: peptide, amino acid, amine, NH_3 , alcohol)

Fig. 6 における γ -L-glutamyl-L-glutamine (Peak 1) および L-グルタミン酸 (Peak 4) は、それぞれ Reaction II (autotranspeptidation⁴⁰⁾) および III により生成したものである。

Table 8 に Reaction II の γ -グルタミル基の供与体を示した。本反応の場合には、グルタチオンは、 γ -GTP-2322 におけると同様に有効な供与体であった。L-アラニンは、受容体として L-ロイシンよりも劣っていた。ところで、 γ -GTP-2322 にあっては、L-グルタミンはほとんど γ -グルタミル基の供与体とならないことが報告されているが⁴¹⁾、ここに得た酵素の場合には γ -GTP-2322 と異なり、L-グルタミンも良好な供与体であった。L-グルタミンを供与体とした場合の Reaction II の受容体を Table 7 に示した。表に示したごとく、その特異性は広く L-アミノ酸のみでなく、 ω -アミノ酸やアミンなども受容体となった。

なお、L-グルタミンを供与体とし、L-ロイシンをその受容体とした場合の Reaction II の至適 pH は 9.0 であり、L-グルタミンおよび L-ロイシンに対する K_m はそれぞれ 1.9 ならびに 0.77 mM であった。

反応 III により加水分解される物質は次のごとくである： γ -L-glutamylglycine (0.82), γ -L-glutamyl-L-alanine (0.66), γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide (0.62),

γ -L-glutamylethanolamine (0.52), D-グルタミン (0.48), γ -Glu-D-Ala (0.44), グルタチオン (0.40), γ -L-glutamylethylester (0.19), なお、かつこ内に L-グルタミン (1.00) に対する相対速度を示した。

L-グルタミンと γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide 水解の至適 pH は 8.5 であった。なお、pH 7.0 以上では Reaction I, II, III は同時に進行するが pH 7.0 以下では Reaction III すなわち水解反応のみが行なわれた。また、これらの反応中に pyrrolidone carboxylic acid の生成はまったく認めなかった。

さて、本酵素の精製過程を通じて Reaction I, II, III の比活性の比率は常に一定であり、しかも Fig. 7 に示した電気泳動において、Reaction I, II の転移反応および Reaction III の L-グルタミンおよび γ -L-glutamyl-*p*-nitroanilide の水解反応は、同一のタンパクバンドに集中した。その後、本酵素をさらに精製し、電気泳動的に単一なバンドを得ているが、この場合にも Fig. 7 に示

Fig. 7. Polyacrylamide gel electrophoretic pattern of the enzyme preparation and distribution of the enzyme activities.

The enzyme preparation (Step VI, about 50 μ g protein for each run) was subjected to electrophoresis according to Davis.⁴²⁾ Sequential gel slices of each run were incubated with given substrates. Arrow indicates the position of the main protein band. BPB shows the position of the marker dye (bromophenol blue). The transferase activities (Reactions I and II) were assayed with the L-glutamine-D-alanine system (●) and the L-glutamine-L-leucine system (△), respectively, and the hydrolytic activity (Reaction III) was assayed with L-glutamine (○) and γ -glutamyl-*p*-nitroanilide (×), respectively.

した四つの活性は、この単一バンドに出現した⁴³⁾。さらに、L-ロイシンは、Reaction I における γ -Glu-D-Ala の生成を阻害し、D-アラニンは、Reaction II による γ -L-glutamyl-L-leucine の生成を妨げる。以上の結果は、Reaction I, II, III が同一の酵素タンパクにより触媒されることを示すものである。

なお、Reaction I, III につき、各種化合物の影響を検討した。両反応は γ -GTP-2322 の阻害剤である 6-diazo-5-oxo-L-norleucine⁴⁴⁾ および L-serine-borate 系⁴⁵⁾ により顕著に阻害を受ける。また植物の γ -glutamyltransferase を活性化するクエン酸⁴⁶⁾ はむしろ両活性を阻害する傾向を示した。

以上、本研究において、L-グルタミンと D-アラニンより γ -Glu-D-Ala を合成する酵素の存在を示した。著者らは、エンドウ幼植物において γ -Glu-D-Ala の生成にあずかる glutamine synthetase [EC 6.3.1.2] および γ -L-glutamylcysteine synthetase [EC 6.3.2.2] 類似のリガーゼ反応の検索を行なったが、その種のリガーゼ反応は検出しえなかった。ゆえに、エンドウの発芽時に特異的に生成する γ -Glu-D-Ala は、ここに見いだした酵素により合成されると考えるのが妥当である。なお、Table 7 で示した本酵素の γ -グルタミル基の受容体に対する挙動は、上述した *in vivo* における D-アミノ酸の γ -L-glutamyl peptide 生成に関する実験結果ともよく一致している。

なお、食用キノコにおいて見いだした D-アミノ酸については前項で述べた。

3. 1-アミノプロリンに関する研究

上記は特殊なアミノ酸類の生成機序ならびに構造決定に関する研究であるが、以下は特殊なアミノ酸類の動物におよぼす影響を検討した例である。

1-アミノプロリン (1-AP) は、タンパク性飼料として利用されているアマニかす粉において、ヒヨコの生育阻害因子として Klosterman ら⁴⁷⁾ により見いだされた天然には珍しいヒドラジノ酸である。

アマニかす粉中の 1-AP は D 型 (1-D-AP) であり γ -グルタミル誘導体として存在し、この誘導体はリナチンとよばれている。Klosterman ら⁴⁷⁾ はリナチンおよび 1-AP がヒヨコに対してビタミン B₆ 拮抗体として作用し、1-AP の D 型、L 型 (1-L-AP) がともに等しい活性を示すと報告している。しかしながら、Klosterman⁴⁸⁾ はリナチンおよび 1-D-AP は哺乳動物には毒性を示さないと述べている。ただし、系統だった詳細な説明は記述されていない。

さて、一般に生物の生理活性物質に対する感受性の差異を吟味することは下記の観点より重要な課題である。

すなわち、ある物質の活性が特定の生物に特異的であれば、その特異性の生じる生化学的機構が問題となる。一方、もしその活性が普遍的であれば、たとえば、いま問題としている 1-AP の場合には新しいビタミン B₆ 拮抗体として生化学その他の分野に広く活用しうることが期待される。

著者らはこのような見地から、まず代表的な実験動物であるラットに対する 1-AP の影響を検討した⁴⁹⁾。

Table 9 において、正常食で飼育した平均体重 95 g のラット (Wistar 系、雄、以下同じ) に体重 1 kg 当たり 26 mg の 1-L-AP を腹腔内注射すると、全ラットが激しいけいれんを起こし、その約半数が死亡した。また Table 10 において、ビタミン B₆ 欠乏食で飼育した平均体重 269 g のラットは、1-L-AP に対してより鋭敏であった。Table 9 および 10 において、けいれんならびに死亡は、ピリドキシン (PN) の投与により完全に防止した。これらの結果は、1-L-AP がビタミン B₆ 拮抗体として作用していることを示すものであり、現実に放射生化学的に 1-L-AP 投与ラットの尿中にピリドキサールの 1-aminopropyl hydrazone が存在することを立証している⁵¹⁾。これは本ヒドラゾンが尿中に排泄されることを証明した最初の研究である。

Table 9. Toxicity of 1-aminoproline in young rats.

1-AP (mg/kg body weight)	PN·HCl (mg/kg body weight)	Alive/total	Convulsion (%)
L-Form			
26 ^{a)}	—	6/10 ^{b)}	100
50	—	0/10 ^{c)}	100
50	79	10/10	0
50	158	10/10	0
D-Form			
26	—	10/10	0
50	—	7/10 ^{d)}	100

Rats : fed the normal diet, *ad libitum*; average body weight, 95 g. Injection : 1-AP was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) just before used, and was injected intraperitoneally. PN was given intraperitoneally 60 min before the injection of 1-AP.

^{a)} The LD₅₀ value of 1-L-AP for the rats fed the normal diet (average body weight, 65 g) was determined to be 26 mg per kg body weight, according to the method of Behrens and Kärber.⁵⁰⁾ ^{b)} Four rats died in 9-18 hr. ^{c)} All the rats died in 3-6 hr. ^{d)} Three rats died in 3-7 hr.

Table 10. Toxicity of 1-amino-L-proline in the vitamin B₆ deficient rats.

Animal	1-L-AP (mg/kg body weight)	PN·HCl (mg/kg body weight)	Alive/total	Convulsion (%)
<i>Ad libitum</i> -fed control ^{a)}	15	—	10/10	0
	50	—	0/10 ^{d)}	100
	50	158	10/10	0
Pair-fed control ^{b)}	15	—	10/10	0
	50	—	3/10 ^{e)}	90
	50	158	10/10	0
Vitamin B ₆ deficient ^{c)}	15	—	3/10 ^{f)}	100
	50	—	0/10 ^{g)}	100
	50	158	10/10	0

Ninety rats (average body weight, 67 g) were divided into three groups of 30 rats each. *Ad libitum* control, control rats fed the normal diet *ad libitum*. Pair-fed control, control rats individually pair-fed with the vitamin B₆ deficient rats. Vitamin B₆ deficient, rats fed the vitamin B₆ deficient diet *ad libitum*. 1-L-AP and PN were injected intraperitoneally, as described in Table 9.

^{a)} Fed for 89 days; average body weight, 511 g.

^{b)} Fed for 88 days; average body weight, 310 g.

^{c)} Fed for 89 days; average body weight, 269 g.

^{d)} All the rats died in 3.5-6 hr.

^{e)} Seven rats died in 4-8 hr.

^{f)} Seven rats died in 6-22 hr.

^{g)} All the rats died 1.5-2 hr.

ところで、1-D-AP は Table 9 に示したごとく、体重 1 kg 当たり 26 mg の投与ではラットにまったく影響を与えず、50 mg の投与によって初めて 10 匹中 3 匹が死亡したにすぎなかった。上記した Klosterman⁴⁸⁾ の 1-D-AP が哺乳動物には毒性を示さなかったという記述は、1-AP の光学異性体に対する配慮が欠けていると考えられる。なお、ある種の微生物においては、1-D-AP が L 型よりも強い活性を示すことが報告されている^{47) 52)}。これらの事実は、1-AP の光学異性体に対する感受性は生物により異なることを示すものであり、その感受性の差異の生じる理由は魅力ある今後の研究課題である。

いずれにしても、上記したごとくその光学異性体を考慮すれば、1-AP は Klosterman⁴⁸⁾ が当初考えていたよりも広い範囲の生物にビタミン B₆ 拮抗体として作用する。なお、ラットに対しては、Table 9 に示したごとく、L 型のほうが D 型よりも有効であったので以下の研究には 1-L-AP を使用した。

さて、1-AP の投与によりラット体内の遊離アミノ酸パターンは著しく乱れる⁴⁹⁾。Table 11 に各種組織、血漿および尿における遊離アミノ酸の測定値を示した。本測定に際しては、正確を期すため形式の異なる 2 種のアミノ酸分析計、すなわち Table 3 に記した System I (Aminex A-5 resin) および Technicon の分析計 (single column, pH gradient) を併用した。

Table 11 において、1-AP 処理により一般にアミノ酸は増加しているが、とくに α -アミノアジピン酸、シトルリン、シスタチオニンの各試料における出現が目立っていた。なお、脳におけるアミノ酸の変動は少なかったが α -アミノアジピン酸は増加していた。ここに述べた 3 種のアミノ酸のうち、リジンの代謝中間体である α -アミノアジピン酸が、ビタミン B₆ 欠乏状態において各種組織、血漿および尿中に顕著に蓄積することを示したのは、本研究が最初である。

さらに、1-AP 処理ラットの尿において、アミノ酸分析計 (System I) でフェニルアラニンの後ろに多量出現するニンヒドリン陽性の物質を β -アミノイソ酪酸 (β AIB) と同定した⁵⁴⁾。

β AIB の C-2 は不斉中心であり、R, S 2 型の光学異性体が存在する。幸い、当時 Solem ら⁵⁵⁾ は β AIB の絶対配置の高感度な決定法を報告していたので、この方法を導入してここに得た β AIB の絶対配置を検討した。

すなわち、1-AP 処理ラット尿より分離した β AIB を *N*-trifluoroacetyl-(S)-prolyl (*N*-TFA-(S)-Pro) 誘導体とし、その誘導体につきガスクロマトグラフィーを行なったのが Fig. 8 である。図において Peak d の保持時間は基準 (R)- β AIB の *N*-TFA-(S)-Pro 誘導体 (Peak b) のそれと完全に一致している。すなわち、ラット尿中の β AIB は R 型である。なお、Fig. 8 B の Peak

Table 11. Effect of 1-amino-L-proline on the free amino acid levels in rat tissues.

Amino acid	Liver		Kidney		Pancreas		Brain		Plasma		Urine	
	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
Glycine	275	268	408	316	382	424	105	96	21.0	36.9	3.950	3.880
Alanine	120	475	64	154	117	347	68	119	16.2	63.3	0.747	1.050
Valine	24	42	27	54	38	78	13	19	12.7	45.4	0.352	0.388
Leucine	23	37	25	44	27	64	12	16	10.3	24.4	0.128	0.327
Isoleucine	14	21	18	25	17	31	7	8	7.8	16.6	0.324	— ^{a)}
Serine	121	203	87	90	73	70	86	64	24.2	24.8	0.819	1.260
Threonine	105	287	96	199	215	375	93	96	39.5	74.5	1.140	3.025
Aspartic acid	83	54	143	155	100	95	225	221	1.1	5.1	0.424	0.626
Glutamic acid	305	225	651	660	591	581	950	1,368	15.9	36.6	0.957	1.173
Asparagine	7	18	17	19	33	42	12	18	3.9	6.5	0.146	0.203
Glutamine	601	330	108	79	295	232	430	297	77.0	47.1	0.730	1.053
Arginine	n.d.	n.d.	5	20	8	13	13	13	5.8	6.0	0.883	0.876
Lysine	59	204	23	64	33	63	33	39	16.8	21.4	0.395	1.300
Cystine	48	44	50	96	25	51	27	21	2.1	6.3	0.463	1.008
Methionine	6	14	9	12	4	11	n.d.	n.d.	1.6	3.3	0.029	0.078
Phenylalanine	9	13	14	— ^{a)}	14	18	11	tr	5.1	6.7	0.175	0.274
Tyrosine	10	46	12	84	16	249	9	26	4.1	53.8	0.086	0.292
Histidine	67	80	11	25	32	33	13	13	5.6	5.4	n.d.	— ^{a)}
Proline	25	— ^{a)}	4	— ^{a)}	60	200	8	41	9.5	— ^{a)}	0.494	— ^{a)}
β -Alanine	53	201	tr	287	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.4	0.231	0.747
γ -Aminobutyric acid	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	236	278	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
α -Aminoadipic acid	tr	350	tr	535	tr	92	tr	11	n.d.	41.3	tr	3.005
Ornithine	24	41	13	40	14	22	4	6	3.4	4.4	0.292	— ^{a)}
Citrulline	tr	309	8	63	51	352	5	11	5.3	69.8	tr	0.662
Cystathionine	n.d.	176	tr	294	tr	83	5	5	n.d.	14.0	tr	22.50
Kynurenine	n.d.	8	n.d.	26	n.d.	6	n.d.	n.d.	0.4	1.3	0.081	— ^{a)}
Y-111	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.018

Tissues : Twelve rats fed the normal diet (average body weight, 82 g) were starved for 13 hr and divided into two groups of six rats each. One group was injected with 50 mg of 1-L-AP per kg body weight intraperitoneally as described in Table 9, and the other group was injected with the buffer solution and was used as the control. After 3 hr, both groups were anesthetized with Nembutal. Picric acid extracts of pooled samples of plasma and the other tissues taken from six rats in each group were prepared according to the method of Tallan *et al.*⁵³⁾ Urine; thirteen rats raised in the same manner as described above (average body weight, 89 g) were starved for 13 hr and were divided into two groups. One group (eight rats) was injected with 26 mg of 1-L-AP per kg body weight and the urine samples of five rats alive were collected in 0.1N HCl for 24 hr and were diluted to a definite volume and were pooled. The other group (five rats) was injected with the buffer solution and was used as the control.

C, Control rats; T, Test rats treated with 1-L-AP; n.d., Non-detectable; tr, Trace.

The values represent $\mu\text{mol}/100\text{ g}$ wet weight for tissues; $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$ for plasma and $\mu\text{mol}/24\text{ hr/rat}$ for urine.

^{a)} Not calculated (overlapped to other peaks).

c は分離 β AIB 画分に混在していた β -アラニンである。Peak b および d のマススペクトルを Fig.9 に示した。

平均体重 84 g のラットの 24 時間尿における β AIB の存在量は次のごとくであった：1-AP 処理ラット, 1.63；

Fig.8. Gas chromatographic separation of the enantiomers of β -aminoisobutyric acid.

A, Authentic *N*-TFA-(*S*)-Pro-(*R*), (*S*)- β AIB methyl ester; B, The sample prepared from urine collected for 24 hr after the injection of 1-L-AP. Peak a, (*S*)- β AIB derivative; Peaks b and d, (*R*)- β AIB derivative; Peak c, β -Alanine derivative (see the text). Gas chromatography, Jeol JHS-01SG-2, 3 mm $\times$ 2 m column packed with 10% SE 30 phase at 180°C.

対照ラット, 0.03 μ mol/mg creatinine. また, Table 12 に示したごとく, 1-AP 処理により肝臓および腎臓においても β AIB は増加し, この場合も *R* 型であった。対照ラットの脾臓その他の組織においては β AIB はほとんど存在せず, また 1-AP 処理によっても変化しなかった。

以上, ラットにおける β AIB はすべて *R* 型であり, *S* 型は検出しえなかった。ヒトの血清⁵⁵⁾⁵⁶⁾およびウシの脳⁵⁷⁾においては, *S* 型の存在が報告されているが動物により *R* 型, *S* 型の存在の仕方に差異の生じる機構は今後の一つの研究課題である。ちなみに (*R*)- β AIB はチミンの代謝中間体である⁵⁸⁾。

次に, 1-AP のメチオニン代謝におよぼす影響を検討した⁵⁹⁾。

ラットに 1-AP と L-[U-¹⁴C] メチオニンを同時に腹腔内注射し, その 24 時間尿中のメチオニンの代謝物を分画したのが Fig.10 である。1-AP 処理により上記し

Fig.9. Mass spectra of *N*-TFA-(*S*)-Pro methyl ester derivatives of authentic (*R*)- β AIB and the isolated compound.

A, Authentic (*R*)- β AIB (peak b in Fig.8A); B, The isolated compound (peak d in Fig.8B).

Table 12. Accumulation of β -aminoisobutyric acid in liver and kidney and its absolute configuration.

Tissue sample ^{a)}	Control rats		1-AP-treated rats	
	μ mol/g wet weight	Absolute configuration	μ mol/g wet weight	Absolute configuration
Liver	0.029	<i>R</i>	0.241	<i>R</i>
Kidney	0.002	<i>R</i>	0.162	<i>R</i>

^{a)} Fifteen rats fed the normal diet (average body weight, 83 g) were starved for 13 hr and divided into two groups. One group (five rats) was treated with 1-L-AP (26 mg/kg body weight) and the other group with the buffer solution, as described in Table 9. Picric acid extracts of the pooled samples were prepared from five rats in the 1-AP-treated group and from ten rats in the control group, 3 hr after the injection, as described in Table 11, and were used for the analyses.

Fig.10. Chromatographic separation of the radioactive compounds in rat urine.

Nine rats fed the normal diet (average body weight, 89 g) were starved for 13 hr and were divided into two groups. One group (six rats) was injected intraperitoneally at the same time with 26 mg of 1-L-AP per kg body weight and with an aqueous solution containing 5 μ Ci of L-[U- 14 C]methionine per rat. Urine was collected in 0.1 N HCl for 24 hr after the injection. The other group (three rats) was injected with 5 μ Ci of L-[U- 14 C]methionine per rat and was used as the control. The radioactive compounds were fractionated by the amino acid analyzer (System I) without coloration with ninhydrin. A, The 1-AP-treated rats (pooled sample of two rats alive, the amounts applied corresponded to 415 μ g creatinine); B, The control rats (pooled sample of three rats, the amounts applied corresponded to 405 μ g creatinine). Cyst, Cystathionine.

た L-シスタチオン (L 型の決定は後述する) のほかに、Compound A, B, C の三つの放射性化合物が出現した。これら放射性化合物は尿のみでなく肝臓、腎臓、脾臓にも存在した。

そこで、尿よりこれら化合物を結晶として単離して構造の解析を行なった。

Compound A は加水分解により等モルの酢酸と L-シスタチオンを与え、L-[U- 14 C]メチオニンの放射能はシスタチオンに局在していた。このことは Compound A が N-monoacetyl-L-cystathionine (N-AC) であることを示すものである。ところで、N-AC には S-

Fig.11. Mass spectra of the N-DMAM methyl ester derivatives of Compound A and authentic N-acetylcystathionine isomers.

A, Compound A; B, N-AC I; C, N-AC II.

[L-2-(acetylamino)-2-carboxyethyl]-L-homocysteine (N-AC I) と S-[L-3-(acetylamino)-3-carboxypropyl]-L-cysteine (N-AC II) の二つの位置異性体が存在するが、両者はその構造上ラネーニッケルによる還元脱硫により生成するアミノ酸より識別しうる。すなわち N-AC I よりは L- α -アミノ-n-酪酸が N-AC II からは L-アラニンが生成する。Compound A は脱硫により L- α -アミノ-n-酪酸を与えた。この結果は Compound A が N-AC I であることを示すものであり、クロマトグラフの挙動およびその N-dimethylaminomethylene methyl ester (N-DMAM methyl ester) 誘導体⁶⁰⁾ のマススペクトル (Fig.11) も基準 N-AC I のそれと完全に一致した。

Compound B, C はアミノ酸分析計 (System I) において下記のごとく L-シスタチオニンスルホキシド (CS) の溶出位置に出現する。すなわち、CS の S 原子は不斉中心であり、二つの diastereoisomer (CS I および II) が存在するが、両者は Fig.12 の E に示したごとくクロマトグラフ的に分画しうる。Compound B, C の溶出位置はそれぞれ基準 CS I および II のそれと一致した (Fig.12 A, B, E)。また Compound B, C はともに還元により L-シスタチオンとなり、酸化により L-シスタチオニンスルホンに転換する (Fig.12 C, D)。これら

Fig.12. Behavior of Compounds B and C on the amino acid analyzer.

A, Compound B (0.10 μ mol); B, Compound C (0.11 μ mol); C, Reduction of the mixture of Compound B (0.10 μ mol) and C (0.11 μ mol) with HI⁶¹¹; D, Oxidation of the mixture of Compound B (0.10 μ mol) and C (0.11 μ mol) with performic acid⁶¹²; E, The authentic compounds: 1, L-Cystathionine sulfone; 2, CS I; 3, CS II; 4, L-Cystathionine.

の結果は Compound B, C がそれぞれ CS I および II であることを示すものであり, Compound B, C の赤外スペクトルも基準 CS I, II のそれと一致した。

これら化合物は, 上述のごとく L-メチオニンを同時に投与しなくても 1-AP 処理のみで出現する。平均体重 89g の 1-AP 処理ラットの 24 時間尿中の存在量は次のごとくであった: N-AC I, 1.37; CS I, 0.44; CS II, 0.60 μ mol/rat。

これらシスタチオン誘導体は, シスタチオン尿症の患者の尿中⁶²⁾⁶³⁾に見だされているがラットにおけるその存在を示したのは本研究が最初である。ゆえに, この発見はこれら化合物の生成の機構, ならびにその意義についての研究をシスタチオン尿症の患者のかわりにラットを用いて行なうことを可能にするものである。

なお, 上記した CS が分離操作中に生成したものかどうかについては, 放射性 L-シスタチオンを用いて反復検討したが, 分離操作中の CS の生成量は, 常に痕跡程度にすぎなかった。CS が, たとえばラット肝臓のミクロソームによる *p*-thioanisidine sulfoxide 生成⁶⁴⁾のごとき酵素酸化により生成するのか, あるいは何らかの非酵素反応によるものかは今後の興味ある検討課題である。

また, 上記の研究に際して二つの新しい方法を開発した。

その一つは, シスタチオンの光学異性体の簡便かつ正確な決定法の確立である⁶⁵⁾。

シスタチオンは, 二つの不斉炭素原子を有しており, そのゆえに Table 13 に示した四つの光学異性体が存在するが, 従来その判別は困難であった。表にシスタチオンの比旋光度を併記したが, I と II および III と IV のそれはそれぞれ近似しており, シスタチオンの場合には比旋光度によって異性体を識別することは不可能である。

今回考案した方法は, シスタチオンのラネーニッケルによる還元的脱硫により生成したアラニンと, α -アミノ-*n*-酪酸の光学的性質を前述の Manning ら²⁸⁾の方法により検討し, それによってもとのシスタチオンの立体配置を決定するものである。

Fig.13 に, 上述した 1-AP 処理ラット尿より単離したシスタチオンおよび L-シスタチオンとして市販されている 1 標品に本法を適用した例を示した。

Fig.13 および Table 14 において 1-AP 処理ラットより得たシスタチオンは, 等モルの L-leucyl-L-alanine と L-leucyl-L- α -amino-*n*-butyric acid を与えた。ゆえにラット尿のシスタチオンは L 型である。一

Table 13. Optical isomers of cystathionine.

Isomer	Configuration of the moiety of cystathionine		[α] _D (1N HCl)
	Alanine moiety	α -Amino- <i>n</i> -butyric acid moiety	
L- [I]	L	L	+23.7°
D- <i>allo</i> - [II]	D	L	+24.5°
D- [III]	D	D	-23.5°
L- <i>allo</i> - [IV]	L	D	-25.0°

Fig.13. Separation of the diastereoisomeric dipeptides prepared from the desulfuration products of cystathionine.

A, Authentic L-leucyl dipeptides (samples used: D- and L-alanine, 0.39 μ mol, respectively; L- and D- α -amino-*n*-butyric acid, 0.28 μ mol, respectively); B, Cystathionine from urine of the 1-AP-treated rats (sample used: 0.67 μ mol); C, Commercial L-cystathionine (sample used: 0.54 μ mol). Peaks 1, 2 and 3 correspond to unreacted alanine, α -amino-*n*-butyric acid and leucine, respectively; Peak 4, L-Leucyl-D-alanine; Peak 5, L-Leucyl-L-alanine; Peak 6, L-Leucyl-D- α -amino-*n*-butyric acid; Peak 7, L-Leucyl-L- α -amino-*n*-butyric acid. Color values relative to leucine (100) were: L-leucyl-D-alanine, 58.5; L-leucyl-L-alanine, 90.3; L-leucyl-D- α -amino-*n*-butyric acid, 56.4; L-leucyl-L- α -amino-*n*-butyric acid, 98.6. Amino acid analyzer, System I.

方、市販のシスタチオニンの場合には等モルの L-leucyl-D- および L-alanine と両者の和にほぼ等しい L-leucyl-L- α -amino-*n*-butyric acid が生成した。このことは市販の標品がほぼ等モルの L-シスタチオンと D-*allo*-シスタチオンよりなる混合物であることを示すものである。

Table 14 に各種のシスタチオン標品につき検討した結果を示した。上記した 1-AP 処理ラット尿より得た

N-AC I ならびに CS I および II について吟味した結果も併記した。この場合 N-AC I は加水分解により、また CS I および II は HI を用いる還元によりシスタチオニンに転換して測定した。

なお、1-AP 処理ラット尿は光学的に純粋な L-シスタチオニンの良好な給源であり平均体重 200 g のラット 10 匹の 24 時間尿より約 100 mg の結晶が得られる。

本研究において確立した第 2 の方法は N-AC I, II の簡易合成法である⁵⁹⁾。

N-AC には N-AC I および II の二つの位置異性体が存在することは上述したが、従来光学的に純粋な両者の調製法についての報告はなかった。

ここに開発した方法は、1-AP 処理ラットより単離した L-シスタチオンを無水酢酸でアセチル化してまず N,N'-diacetyl-L-cystathionine を合成し、これを 1N HCl により 80°C で 30 分間加水分解後、生成した N-AC I および II を Dowex 1 $\times$ 4 カラムにより分画するというきわめて簡便なものである。この方法により光学的に純粋な N-AC I, II を同時に調製することができる。

また、上記の一連の研究を遂行している過程において、1-AP 処理ラット尿中に種々の N-メチル化塩基性アミノ酸が増加することを見だし、その原因を追求している際に正常ラット尿中に 9 種 (Compound I~IX) のニヒドリン陰性の塩基性アミノ酸誘導体の存在を認めた。ゆえに、これら化合物を単離して構造の解析を行った⁶⁷⁾。

単離した各誘導体は加水分解により、Table 15 のごとく等モルの酢酸と各種の塩基性アミノ酸を与えた。この結果は、これら化合物がそれぞれの塩基性アミノ酸の N α -アセチル誘導体であることを示すものである。なお、Compound VI からは等モルの酢酸と β -アラニンおよびヒスチジンが生成したが、Matsuo ら⁷⁰⁾の方法によりその C 末端はヒスチジンであることを証明した。また、本物質はニヒドリン陰性であり、遊離のアミノ基が存在しないことは明らかであるが、このことをさらに Sanger⁷¹⁾の方法で確かめた。これらの事実は、Compound VI が N α -(N-acetyl- β -alanyl) histidine (N-acetylcarnosine) であることを示すものである。

上記の結果および各化合物のマススペクトル、ならびにクロマトグラフの挙動により、Compound I~IX をそれぞれ N α -acetyllysine (0.47), N α -acetylhistidine (0.07), N α -acetyl-N α -methylhistidine (0.56), N α -acetyl-N α -methylhistidine (2.04), N α -acetylarginine (0.62), N-acetylcarnosine (0.30), N α -acetyl-N α -N α -dimethylarginine (0.50), N α -acetyl-N α -N α -dimethylarginine (0.08), N α -acetyl-N α , N α , N α -tri-

Table 14. Optical properties of the desulfuration products of cystathionine.

Sample	Molar ratio of the products (%)				Configuration of Cystathionine
	L-Leu-D-Ala	L-Leu-L-Ala	L-Leu-D-Abu ^{a)}	L-Leu-L-Abu	
Natural sources					
Cystathionine ^{b)} (rat urine)	0	50	0	50	L
Cystathionine (<i>A. bisporus</i>)	0	50	0	50	L
N-AC I(rat urine)	0	50	0	50	L
CS I and II(rat urine)	0	50	0	50	L
Commercial					
L-Cystathionine ^{c)}	25	25	2	48	L+D- <i>allo</i>
Synthetic cystathionine ^{d)}	25	25	26	24	Mixture of four optical isomers

^{a)} Abu : α -Amino-*n*-butyric acid.

^{b)} $[\alpha]_D = +25^\circ$ (1 N HCl).

^{c)} $[\alpha]_D = +24^\circ$ (1 N HCl). The $[\alpha]_D$ was represented to be $+23^\circ \pm 3$ (1 N HCl) by the supplier.

^{d)} Synthesized according to Schöberl and Täuber.⁶⁶⁾

Table 15. Stoichiometric formation of acetic acid and amino acids by hydrolysis.

Compound	Product formed (μ mol)	
	Acetic acid	Amino acid
I	0.55 ± 0.02	Lysine
II	0.40 ± 0.01	Histidine
III	0.53 ± 0.01	<i>N</i> α -Methylhistidine
IV	0.46 ± 0.01	<i>N</i> γ -Methylhistidine
V	0.39 ± 0.01	Arginine
VI	0.29 ± 0.02	β -Alanine
		Histidine
VII	0.42 ± 0.01	<i>N</i> ϵ , <i>N'</i> ϵ -Dimethylarginine
VIII	0.36 ± 0.02	<i>N</i> ϵ , <i>N</i> γ -Dimethylarginine
IX	0.29 ± 0.01	<i>N</i> ϵ , <i>N</i> γ , <i>N</i> δ -Trimethyllysine

Acetic acid was determined enzymatically according to Bergmeyer and Möllering⁶⁸⁾ after hydrolysis with 2 N KOH at 100°C for 2 hr. Amino acids were assayed by the automatic amino acid analyzer after hydrolysis with 2 N HCl at 100°C for 2 hr. *N* ϵ , *N'* ϵ -Dimethylarginine and *N* ϵ , *N* γ -dimethylarginine were determined with the resin/buffer system described by Kakimoto and Akazawa,⁶⁹⁾ and the other amino acids were analyzed with System I. The values are expressed as means $\pm$ S.D., $n=3$.

methyllysine (0.28) と同定した。なお、上記のかっこ内に平均体重 211 g の正常ラットの 24 時間尿中の存在量を記した (μ mol/rat)。

上述した化合物のうち、*N* α -acetyllysine, *N* α -acetylhistidine, *N* α -acetyl-*N* γ -methylhistidine および *N* α -acetylarginine は動物の組織や尿において見いだされている^{72)~76)}。しかしながら、残りの五つの化合物の動物尿における存在に関しては、従来報告がなかった。*N*-acetylcarnosine は、ウサギの筋肉および腎臓に存在す

ることが示されている⁷⁷⁾が、尿中への排泄に関する記載はない。また、放射性 *N* α -methylhistidine⁷⁸⁾ および *N* ϵ , *N* γ -trimethyllysine⁷⁹⁾ を投与したラットの尿中にそれぞれの放射性 *N* α -アセチル化合物が排泄されることは認められているが、両 *N* α -アセチル化合物は、これまで自然状態のラット尿中においては検出されていなかった。さらに、*N* α -acetyl-*N* ϵ , *N'* ϵ -dimethylarginine および *N* α -acetyl-*N* ϵ , *N* γ -dimethylarginine の生体における存在を明らかにしたのは本研究が最初である。

上記したごとく、1-AP に関する研究は種々の知見を提供するものである。ゆえに 1-AP は有効な生化学試薬として使用しうる。なお、上述した、生物により 1-AP の光学異性体に対する感受性が異なるという事実を巧みに活用することも可能である。

以上、本稿においては著者らの行なっている現在の研究について記述したが、食飼料中の特殊なアミノ酸類に関する研究は戦後発展した新しい学問分野である。ゆえに、この領域における研究は諸種の興味ある事象の発見に連なるものであり、食品化学上重要であるのみでなく生化学的にも有意義である。

本研究の遂行に当たり、ご指導、ご鞭達を賜りました恩師、故・京都大学名誉教授近藤金助先生に謹んで感謝の意を捧げます。また、種々ご助言をいただきました諸先輩ならびに徳島大学医学部栄養学科の各位に厚くお礼申しあげます。さらに、本研究にご協力いただきました研究室の諸氏に深謝いたします。

文 献

- Weaver, R.F., Rajagopalan, K.V., Handler, P., Rosenthal, D. and Jeffs, P.W. : *J. Biol. Chem.*, **246**, 2010 (1971)
- Levenberg, B. : *J. Biol. Chem.*, **239**, 2267 (1964)
- Sasaoka, K., Ogawa, T., Tsuji, H. and Bando, N. : *Biochim. Biophys. Acta*, **630**, 137 (1980)
- Hammond, J.B.W. and Nichols, R. : *J. Gen. Microbiol.*, **93**, 309 (1976)
- Tsuji, H., Bando, N., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 541 (1981)
- Haslam, E. : *The Shikimate Pathway* (1974), Butterworths (London)
- Tsuji, H., Bando, N., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 326 (1981)
- Fierz-David, H.E. and Kuster, W. : *Helv. Chim. Acta*, **22**, 82 (1939)
- Reverdin, F. and Dresel, A. : *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **38**, 1593 (1905)
- Birch, A.J., Moye, C.J., Rickards, R.W. and Vanek, Z. : *J. Chem. Soc.*, 3586 (1962)
- Dewick, P.M. and Haslam, E. : *Biochem. J.*, **113**, 537 (1969)
- Prescott, L.F. : *J. Pharm. Pharmacol.*, **23**, 807 (1971)
- Hendrickson, J.B. : *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 1251 (1961)
- Reio, L. and Ehrensvärd, G. : *Ark. Kemi*, **5**, 301 (1953)
- Baddiley, J., Ehrensvärd, G., Klein, E., Reio, L. and Saluste, E. : *J. Biol. Chem.*, **183**, 777 (1950)
- Sprecher, M., Srinivasan, P.R., Sprinson, D.B. and Davis, B.D. : *Biochemistry*, **4**, 2855 (1965)
- Srinivasan, P.R. : *The Enzymes of Glutamine Metabolism* (Prusiner, S. and Stadtman, E.R., eds.), 545 (1973), Academic Press (New York)
- Francis, M.M. and Westlake, D.W.S. : *Can. J. Microbiol.*, **25**, 1408 (1979)
- Oka, Y., Tsuji, H., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 253 (1981)
- Oka, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1995 (1979)
- Oka, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1959 (1980)
- Benson, J.V., Jr., Gordon, M.J. and Patterson, J.A. : *Anal. Biochem.*, **18**, 228 (1967)
- Teale, F.W.J. and Weber, G. : *Biochem. J.*, **65**, 476 (1957)
- Oka, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *J. Nutr. Vitaminol.*, **30**, 27 (1984)
- Ogawa, T., Oka, Y. and Sasaoka, K. : *Phytochemistry*, **23**, 684 (1984)
- Meyer, C.E. and Rose, W.C. : *J. Biol. Chem.*, **115**, 721 (1936)
- Kitagawa, Y. and Sugimoto, E. : *Biochim. Biophys. Acta*, **582**, 276 (1979)
- Manning, J.M. and Moore, S. : *J. Biol. Chem.*, **243**, 5591 (1968)
- Fujii, S. and Maruoka, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **717**, 486 (1982)
- Sasaoka, K., Ogawa, T. and Fukuda, M. : *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 383 (1972)
- Ogawa, T., Fukuda, M. and Sasaoka, K. : *Biochim. Biophys. Acta*, **297**, 60 (1973)
- Fukuda, M., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Biochim. Biophys. Acta*, **304**, 363 (1973)
- Ogawa, T., Fukuda, M. and Sasaoka, K. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **52**, 998 (1973)
- Fukuda, M., Tokumura, A., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Phytochemistry*, **12**, 2593 (1973)
- Ogawa, T., Bando, N. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 1661 (1976)
- Ogawa, T., Kimoto, M. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1811 (1977)
- Ogawa, T., Kawasaki, Y. and Sasaoka, K. : *Phytochemistry*, **17**, 1275 (1978)
- Kawasaki, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1 (1982)
- Kawasaki, Y., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Biochim. Biophys. Acta*, **716**, 194 (1982)
- Orlowski, M. and Meister, A. : *J. Biol. Chem.*, **240**, 338 (1965)
- Tate, S.S. and Meister, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 3329 (1974)
- Davis, B.J. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964)
- Ogawa, T., Kawasaki, Y. and Sasaoka, K. : (unpublished results)
- Griffith, O.W. and Meister, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 268 (1979)
- Tate, S.S. and Meister, A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 4806 (1978)
- Goore, M.Y. and Thompson, J.F. : *Biochim. Biophys. Acta*, **132**, 15 (1967)
- Klosterman, H.J., Lamoureux, G.L. and Parsons, J.L. : *Biochemistry*, **6**, 170 (1967)

- 48) Klosterman, H.J. : *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 13 (1974)
- 49) Sasaoka, K., Ogawa, T., Moritoki, K. and Kimoto, M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **428**, 396 (1976)
- 50) Behrens, B. and Kärber, G. : *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **177**, 379 (1935)
- 51) Tsuji, H., Moritoki, K., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1413 (1977)
- 52) Parsons, J.L., Klosterman, H.J. and Ninemann, J.L. : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **415** (1968)
- 53) Tallan, H.H., Moore, S. and Stein, W.H. : *J. Biol. Chem.*, **211**, 927 (1954)
- 54) Ogawa, T., Kimoto, M., Tsuji, H. and Sasaoka, K. : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 137 (1978)
- 55) Solem, E., Jellum, E. and Eldjarn, L. : *Clin. Chim. Acta*, **50**, 393 (1974)
- 56) Gejyo, F., Kinoshita, Y. and Ikenaka, T. : *Clin. Chim. Acta*, **70**, 407 (1976)
- 57) Kakimoto, Y., Kanazawa, A., Nakajima, T. and Sano, I. : *Biochim. Biophys. Acta*, **100**, 426 (1965)
- 58) Fink, K., Henderson, R.B. and Fink, R.M. : *J. Biol. Chem.*, **197**, 441 (1952)
- 59) Kimoto, M., Ogawa, T. and Sasaoka, K. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 336 (1981)
- 60) Thenot, J.P. and Horning, E.C. : *Anal. Lett.*, **5**, 519 (1972)
- 61) Datko, A.H., Giovanelli, J. and Mudd, S.H. : *Anal. Biochem.*, **64**, 80 (1975)
- 62) Perry, T.L., Hansen, S., Love, D. and Finch, C.A. : *Nature (London)*, **219**, 178 (1968)
- 63) Kodama, H., Ishimoto, Y., Shimomura, M., Hirota, T. and Ohmori, S. : *Physiol. Chem. Phys.*, **7**, 147 (1975)
- 64) Kexel, H. and Schmidt, H.L. : *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 1009 (1972)
- 65) Ogawa, T., Kimoto, M. and Sasaoka, K. : *Anal. Biochem.*, **105**, 32 (1980)
- 66) Schöberl, A. and Täuber, G. : *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **599**, 23 (1956)
- 67) Sasaoka, K., Ogawa, T. and Kimoto, M. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**, 454 (1982)
- 68) Bergmeyer, H.U. and Möllering, H. : *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 3 (Bergmeyer, H.U., ed.), 1520 (1974), Academic Press (New York)
- 69) Kakimoto, Y. and Akazawa, S. : *J. Biol. Chem.*, **245**, 5751 (1970)
- 70) Matsuo, H., Fujimoto, Y. and Tatsuno, T. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **22**, 69 (1966)
- 71) Sanger, F. : *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945)
- 72) Young, V.R., Alexis, S.D., Baliga, B.S. and Munro, H.N. : *J. Biol. Chem.*, **247**, 3592 (1972)
- 73) Armstrong, M.D. and Robinow, M. : *Pediatrics*, **39**, 546 (1976)
- 74) Shaw, K.N.F., Boder, E., Gutenstein, M. and Jacobs, E.E. : *J. Pediatr.*, **63**, 720 (1963)
- 75) Ohkusu, H. and Mori, A. : *J. Neurochem.*, **16**, 1485 (1969)
- 76) Terheggen, H.G., Lowenthal, A., Lavinha, F. and Colombo, J.P. : *Arch. Dis. Child.*, **50**, 57 (1975)
- 77) Sobue, K., Konishi, H. and Nakajima, T. : *J. Neurochem.*, **24**, 1261 (1975)
- 78) Tamaki, N., Harada, M., Ikeda, T. and Hama, T. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **24**, 547 (1978)
- 79) Zaspel, B.J., Sheridan, K.J. and Henderson, L.M. : *Biochim. Biophys. Acta*, **631**, 192 (1980)

(昭和59年11月21日受理)