$$E_1 = \frac{E_0}{D_1} \times \frac{1}{51}, \quad E_2 = \frac{E_0}{D_2} \times \frac{V}{10}$$

$$\frac{E_1}{E_2} = \frac{D_2}{D_1} \times \frac{10}{51V}$$

$$k_1(\text{min.}) = k_2(\text{sec.}) \times \frac{10 D_2}{51V \cdot D_1} \times 60$$

となる。滴下法のみから Kat. f. を求める目的で k_1 を算出する場合には D_1 は任意に定めてよい。但し酵素液 1 cc 中の固形分の量をそれに應じて計算する。

Table 1 の SUMNER 法の實驗結果から $t \rightarrow 0$ に外挿した $k_1(\text{min.})$ を求めると 0.0427 となる。又滴下法から上式によつて k_1 を求めると

$$k_1 = 0.0116 \times \frac{10 \times 50}{51 \times 0.062 \times 2,500} \times 60 = 0.0440$$

となり SUMNER 法による實測値より僅かに大きい値を與えるけれども Kat. f. の測定には大して問題にならないのみならず SUMNER 法で外挿するよりも恒定した値が得られ、より合理的であると思われる。

總 括

BONNICHSEN, CHANCE, THEORELL のカタラーゼ定量法を改良した滴下法に就て述べ、SUMNER 法と比較検討し、定量法として満足すべきものであることを明らかにした。

本研究實施に當り御指導を戴いた大島康義教授に深甚の謝意を表明する。尙本研究は文部省科學研究費によつて行われたものである。

- (1) H. v. EULER, K. JOSEPHSON: *Ber.*, 56, 1749 (1923); *Ann.*, 452, 158 (1927)
- (2) S. HENNICH: *Biochem. Z.*, 145, 287 (1924)
- (3) J. B. SUMNER, G. F. SOMERS: *Chemistry and Methods of Enzymes*, New York, p. 25 (1943)
- (4) R. K. BONNICHSEN, B. CHANCE, H. THEORELL: *Acta Chem. Scand.*, 1, 42 (1947)
- (5) 小倉安之, 日野精一, 殿村雄治: 酵素化學シンポジウム, 1, 42 (149)

Summary

A rapid determination of catalase activity by "drop method", which involves dropping of the enzyme solution into the substrate mixture, was proposed. This method yields more accurate results than BONNICHSEN's and any others. The monomolecular velocity constant obtained is fairly independent of reaction time and proportional to the enzyme concentration.

禾穀類の葉に於けるビタミン B₁ の生成に関する研究⁽¹⁾

近藤金助, 満田久輝, 岩井和夫 (京都大學農學部營養化學實驗室)

昭和 25 年 3 月 25 日 受理

Studies on Synthesis of Vitamin B₁ in the Leaves of Cereal Crops.

By Kinsuke KONDO, Hisateru MITSUDA and Kazuo IWAI

(Lab. of Nutritional Chemistry, Agricultural Faculty, University of Kyoto)

米麥の如き禾穀類の種實, 殊にその胚にビタミン B₁ (以下 B₁ と記す) が濃厚に集積していることは周知の事實である。而してこの B₁ は禾穀類の生育期を通じて生緑葉中にて生成することは無理なく豫想し得られる。筆者等は、水稻と大麥の生緑葉中にて B₁ が生成せられて穀實中へ移行集積することを實驗し、併せて B₁ 生成の機作について知見を得たので以下これを報告する。

I. 實 驗 成 績

(1) 水稻の生育各期に於ける葉部及び穂部中の B₁ の消長: 京大農場にて栽培した水稻(京都旭)を選び、分蘗、穂孕、出穂、開花、乳熟、黄熟、完熟、枯熟の各期に於ける葉部及び穂部中の B₁ を彙に報告した方法⁽²⁾に従つて形態別に Diazo 法によつて定量した。試料は毎回定時 10 a. m. に採集し、直ちに定量に供した。實驗は 1947 年度と 1948 年度の 2 回行つたが 1948 年の結果を Fig. 1 に示してみる。横軸は試料採集の日附を示してをる。

Fig. 1 が示す通り葉部にあつては B₁ 總量は乳熟、黄熟期(9 月下旬~10 月上旬)に最高に達する。結合型と遊離型についてみれば、前者は黄熟期迄は逐次増量するが、後者は出穂後は殆んど増量しない。穂部に於ける B₁ は遊離型が大部を占めることが特徴であつて、出穂後遊離型は完熟に至るまで著しく増量を續けるが、結合型は黄熟期後は減量する。而して Fig. 1 を吟味すれば、黄熟期まで葉部に於て盛んに生成された B₁ の大部は穂部に移行集積し、黄熟期以後葉部に於ける B₁ の生成は衰えるがすでに葉部に於て生成されてをる B₁ は引續いて穂部に移行することを推定し得る。此の推定を確めるために後段の實驗を行つた。

(2) 葉部中にて生成した B₁ が穂部に移行することを證明する實驗: 葉部中にて生成した B₁ は葉鞘に下降し莖部を経て穂部に上昇、籾中に集積することは他の養分と同様であろう。此のことを證明するために次の實驗を行つた。

完熟期の水稻を 2 區に分ち、試験區に於ては穂頸を切除して日數の経過と共に葉部、莖部中の B₁ の消長を對照區のものと比較してみた。その結果は Table 1 の如く、穂頸切除後 7 日間に於ける葉部中の B₁ の減量は對照區のものに比して著しく緩慢である。而して莖部中の B₁ 量は 7 日後に

Fig. 1 Increase and Decrease of the Quantity of Vitamin B₁ in the Rice-plant in Various Periods of Growing.

Table 1. Increase and Decrease of the Quantity of Vitamin B₁ in the Leaf and Stem of the Rice-plant from which the Ear-necks have been cut off.

Sample		Forms of Vitamin B ₁	Date of collection and weather		
Kinds	Parts		Oct. 14th cloudy* γ%	Oct. 17th cloudy γ%	Oct. 21th fine γ%
The rice-plant from which the ear-necks have been cut off.	Leaf	Total-B ₁	132.0	81.3	61.9
		Free-B ₁	36.5	46.3	38.9
		Ester-B ₁	95.5	35.0	23.0
		Free-B ₁ Total-B ₁ × 100	27.7	56.9	62.8
	Stem	Total-B ₁	33.6	—	36.7
Control (which has the ear-necks)	Leaf	Total-B ₁	132.0	—	48.5
	Stem	Total-B ₁	33.6	—	26.8

* (the ear-necks are cut off)

は切除前に比べて増量している。之に反して對照區のものは 7 日後には葉部及び莖部中の B₁ は共に著しく減量している。之は完熟期に達しているため、葉部中にては B₁ の生成は衰えたが尙既に葉部中に生成してあつた B₁ は穂部への移行を續けていることを物語るのである。而して穂頸を切除した水稻にあつては葉部中の B₁ は移行先を失つて葉部及び莖部に停留し、而も葉部中の 遊離型 B₁/總量 B₁ は穂頸切除前の常値 27.7% か

ら日を経るに従つて高まり, 1 週間後には 62.8% となつて穂部に於ける B_1 の常値に近づくことは葉部から穂部へ B_1 が移行することを裏書しているのだと思う。此の實驗を乳熟, 黄熟期に行えば上記の事實を更によく證明する data を得るであらう。

次には水稻の葉部を切除した後の穂部について逐日 B_1 を定量してみたが B_1 の増量も形態の變化をも認め得なかつた。之に對して同時に B_1 の定量を行つた對照區の穂部には逐日 B_1 が増加することを實驗した。

此の data によつて穂部中の B_1 は葉部から供給されたものの集積であることが一層判明したわけである。

(3) 葉部中にて B_1 が生成することを證明する實驗: 植物組織内には先ず pyrimidine-, thiazole-derivatives が生成し, 然る後この derivatives が集成して B_1 になることは生體內での B_1 生成の一過程であると考えられる。そこで筆者等はこのことを實證するために 2-methyl-4-amino-5-aminomethyl pyrimidine-hydrochloride と 4-methyl-5- β -oxyethyl thiazole の稀薄水溶液に水稻の生葉から調製した粗酵素液を作用せしめたが, この場合 cysteine を添加して暗所に 28°, 20 時間保つた時にのみ B_1 の生成を認め得たのである。(Table 2).

Table 2. Experiments on Synthesis of Vitamin B_1 by means of Water-extract from Leaves of Rice-plants.

$ \begin{array}{c} \text{N}=\text{C.NH}_2\text{HCl} \\ \\ \text{H}_3\text{C.C} \quad \text{C.CH}_2\text{NH}_2\text{HCl} \\ \quad \\ \text{N}-\text{CH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \\ \quad \\ \text{N}=\text{C}=\text{C} \\ \quad \\ \text{H} \quad \text{S} \end{array} $		2-Methyl-4-amino-5-aminomethyl-pyrimidine	(Preparation of crude enzyme solution)			
		4-Methyl-5- β -oxyethyl thiazole	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"> Leaf of the rice-plant 10 g (Senbon-asahi) </div> <div style="margin-left: 20px;"> ↓ —H₂O —Ground in a stone-mortar. —Pressed with cotton-cloth. </div>			
			Crude enzyme solution 100 cc			
No.	3 mg% Pyrimidine cc	3 mg% Thiazole cc	Crude enzyme solution cc	Conditions	Quantity of Vitamin B_1 r	Increase of B_1 over the control (No. 5) r
1	10	10	10	28°C, 20 hrs.	0.53	-0.01
2	10	10	10	28°C, 20 hrs.	0.40	-0.14
3	10	10	10	28°C, 20 hrs. +0.02 g Cysteine	0.72	+0.18
4	10	10	10	ditto*	0.40	-0.14
5	—	—	10	28°C, 20 hrs.	0.54	—

* Exposed to the sunlight for 2 hrs.

Table 2 の實驗によつて判斷すれば pyrimidine-, thiazole-derivatives を B_1 に結合せしめる酵素が水稻生葉中に存在するならば, その酵素は cysteine の如き Redox potential を negative にする物質の存在を必須と

Table 3. Experiments on Synthesis of Vitamin B_1 by mean of Water-extract from Leaves of Barley.

No.	3 mg % Pyrimidine cc	3 mg % Thiazole cc	M/15 Phosphate buffer (pH=7) cc	Water- extract cc	H ₂ O cc	Addition	Quantity of B_1 r	Increase of B_1 over the control (No. 7) r
1	10	—	10	10	10	—	0.48	-0.04
2	—	10	10	10	10	—	0.48	-0.04
3	10	10	10	10	—	—	0.48	-0.04
4	10	10	10	10	—	10 mg Vitamin C	0.66	+0.14
5	10	10	10	10	—	10 mg Glutathione	0.72	+0.20
6	10	10	10	10	—	10 mg Cysteine	0.76	+0.24
7	—	—	10	10	20	—	0.52	—

Conditions: 25°C, 18 hrs. in an incubator (dark place)

するのであると解釋し得る。生體組織内にあつて cysteine と同様に Redox potential を negative にする物質としては還元型 glutathione, *l*-ascorbic acid などがある。之らも亦 cysteine と同様な役目を果すことは Table 3 によつて判然とするであらう。即ち *l*-ascorbic acid, 還元型 glutathione 及び cysteine を加えた時のみ B₁ が生成されている。此の場合には大麥（白珍子種）の生綠葉から前同様にして粗酵素液を調製したのである。

翻つて LIPMANN⁽³⁾ 及び ZIMA & WILLIAMS⁽⁴⁾ 等は B₁ がその還元型と酸化型との間に Redox system を生成することを實驗證明し就中 ZIMA et al⁽⁵⁾ は B₁-disulphide が cysteine 或いは還元型 glutathione によつて B₁ に還元することを報告している。之によれば Table 2, 3 の場合にも cysteine などの還元作用によつて轉型した B₁ を定量したのではなからうかとの疑いも生ずるわけである。のみならず藤田等⁽⁶⁾ によれば市販の cysteine-HCl は 72.4% の B₁ を含む例もあるという。従つて之等の疑いを解くために水稻綠葉を 0.01% cysteine 水溶液にて抽出した液を酵素液として Table 4 の如き實驗を行つた。

Table 4. Experiments on Synthesis of Vitamin B₁ using 0.01% Cysteine-extract from Leaves of Rice-plants.

No.	3 mg% Pyrimidine cc	3 mg% Thiazole cc	0.01% Cysteine- extract cc	H ₂ O cc	Total volume cc	Conditions	Quantity of Vitamin B ₁ γ	Increase of B ₁ over the control (No.5) γ
1	10	—	10	10	30	20°, 20 hrs.	0.448	+0.08
2	—	10	10	10	30	ditto	0.368	0
3	10	10	10	—	30	ditto	0.560	+0.192
4	10	10	—	10	30	ditto	0	—
5	—	—	10	20	30	ditto	0.368	—

之に依れば Table 4, No. 5 の data 即ち pyrimidine-, thiazole-derivatives を含む場合に於てのみ B₁ が増量している。それ故に Table 2, 3 に於ても水稻又は大麥の生綠葉中の酵素が cysteine 等の共存によつて, pyrimidine-, thiazole-derivatives を B₁ に集成したことは確認出来ると思う。

II. 考 察

BONNER⁽⁷⁾, ROBINS⁽⁸⁾ et al, SHIVE⁽⁹⁾ 等は B₁ が根の發育を促進することなどを報告し, BONNER⁽¹⁰⁾ et al 茶珍⁽¹¹⁾, 赤堀⁽¹²⁾ 等は B₁ が植物體內で生成することを報告している。

筆者等の實驗によれば水稻にありては生育最も旺盛な時期に葉部に於て B₁ が生成し, 米粒中に移行集積する。而して葉部に於ては B₁ 總量の約 2/3 が結合型であるのに對して, 米粒中の B₁ はその大部分は遊離型である。此のことは種實中の B₁, 生綠葉中の B₁ の任務の相異に原因することであつて, 意義深長である。即ち生綠葉中で生成した B₁ はそのままの形態で穂部へ移行して大部分が遊離型のままで米粒のうちに集積するが, 葉部に残留する B₁ の大部分は Ester 型 B₁ となつて葉部内で營まれる各種化合物の集成反應を觸媒するのである (Fig. 1 参照)。

Pyrimidine-, thiazole-derivatives の混液に水稻又は大麥の生綠葉からの粗汁を作用せしむれば cysteine, glutathione 又は *l*-ascorbic acid の存在に於てのみ B₁ が生成することは多くの示唆を與える。之によれば, 生綠葉中にては B₁ の前身者として或いは pyrimidine-, thiazole-derivatives が生成する場合を想定することが出来よう。而して此の 2 derivatives は生綠葉中の酵素によつて結合して B₁ となるのであらう。その際, cysteine, glutathione 或は *l*-ascorbic acid は此の酵素作用進行のために必須であると考え得る。之に依つて生綠葉の如くに集成反應が盛んに營まれている部分に *l*-ascorbic acid, glutathione などが存在することの意義の一つがわかるのである。

III. 要 約

(1) 1947 年, 1948 年の 2 回に亘り, 水稻の全生育期を通じて週期的に葉部及び穂部中の B₁ を兩型にわけて定量した。

(2) 水稻の完熟期に於て葉部或は穂頭を切斷後に於ける B₁ の消長及び形態の變化をみた。

(3) 前記の實驗によつて得た data によつて, 水稻にあつては乳熟, 黄熟期 (京都地方では 9 月下旬~10 月上旬) に亘つて葉部に於て最も盛んに B₁ が生成し, その大部分は遊離型のままで穂部に移行し, 葉部に残留し

た B_1 の大部分は Ester 型となつて觸媒の役割をつとめることを證明或は論述した。

(4) 生綠葉中では先ず pyrimidine-, thiazole-derivatives が生成する場合を想定し, そのもとに, 之等の derivatives から B_1 が生成されるには cysteine, 還元型 glutathione, 或は *l*-ascorbic acid の如き Redox potential を negative にする物質の存在が必須であることなどを實驗證明した。

本實驗は千畑一郎, 壬生良, 福田隆の三君の協力によつて遂行し得たものである。

又本實驗に使用せる pyrimidine と thiazole とは學術會議ビタミン B 研究特別委員會の御好意により入手したものである。茲に誌して深甚の謝意を表する次第である。

- (1) 近藤, 満田, 岩井: 學術研究會議ビタミン B 研究特別委員會 (昭和 23 年 1 月 13 日), 日本農藝化學會關西支部例會 (昭和 23 年 1 月 17 日), 日本農學大會 (昭和 24 年 4 月 10 日) 並にビタミン學會 (昭和 24 年 5 月 27 日) に於て講演。
- (2) 近藤, 満田, 岩井: 化研講演集 18 輯, 30 (昭和 24 年)
- (3) F. LIPMANN & G. PERLMANN: *J. Amer. Chem. Soc.*, 60, 2574 (1938)
- (4) O. ZIMA & R. R. WILLIAMS: *Ber.*, 73, 941 (1940)
- (5) O. ZIMA, K. RITSERT & Th. MOLL: *Z. physiol. Chem.*, 267, 210 (1941)
- (6) 藤田, 上西: 學術研究會議ビタミン B 研究特別委員會記事 第 29 號, 20 頁 (1949 年 3 月 6 日)
- (7) J. BONNER: *Science*, 85, 183 (1937)
- (8) W. J. ROBBINS & M. A. BARTLEY: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 23, 385, 388 (1937)
- (9) J. W. SHIVE: *C. A.* 7982 (1940)
- (10) J. BONNER & E. R. BUCHMAN: *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24, 431 (1938)
- (11) 茶珍: 大阪市生活科學研究所報告 16, No. 2 (1944); 17, No. 1 (1945)
- (12) 赤堀, 上原, 山口: 學術會議ビタミン B 研究特別委員會記事 第 19 號. (昭和 22 年 12 月 2 日)

Summary

We have determined periodically the quantity of vitamin B_1 in the leaf, ear and stem of the rice-plant during the fruiting-period. The vitamin was also determined in such parts of the rice-plant, from which the ear-necks or leaves were cut off. The result has shown that vitamin B_1 is synthesized in the leaf, transferred into the ear and reserved in the rice-kernel.

In the rice-leaf vitamin B_1 is physiologically active and takes the combined form for the most part, and in the rice-ear or kernel it takes the free form for the most part.

Vitamin B_1 in the rice-leaf is synthesized most actively at the end of September when the carbon assimilation in the rice-leaf is the most prominent in Kyoto district.

Using the leaf-extract of the rice-plant or barley, we have studied the mechanism of synthesis of vitamin B_1 from the forms of pyrimidine and thiazole, and found that the vitamin synthesized only when one of cysteine, glutathione and *l*-ascorbic acid, which is considered to make redox potential negative in living tissue, exists.