β -amylase が phosphorylase の activator として加えた澱粉を分解して activator としての能力を失わせてしまうからであることを見出した。更に甘藷中に phosphorylase が存在することを直接に證明するため、甘藷抽出物より phosphorylase の精製を企て、 β -amylase 作用の割合に少い酵素液を調製することに成功した。

本講演の要旨は 1950 年 5 月 27 日日本農藝化學會東京支部講演會に於て發表した。

- (1) 中村, 山崎, 丸尾: 農化, 24, 255 (1951)
- (2) 中村, 丸尾: 農化, 24, 197 (1951)
- (3) CORI, C. F., CORI, G. T., and GREEN, A. A.: *J. Biol. Chem.*, 151, 39 (1943)
- (4) HIDY, P. H., and DAY, H. G.: *ibid.* 152, 479 (1944)
- (5) HANES, C. S., *Proc. Roy. Soc., Ser., B*, 128, 421 (1940); 129, 174 (1940)
- (6) GREEN, D. E., and STUMPF, P. K.: *J. Biol. Chem.*, 142, 355 (1942)
- (7) CORI, G. T., and CORI, C. F.: *ibid.* 151, 57 (1943)
- (8) HIDY, P. H., and DAY, H. G.: *ibid.* 160, 273 (1945)
- (9) PROEHL, E. C., and DAY, H. G.: *ibid.* 163, 677 (1946)
- (10) SUMNER, J. B., SOMERS, G. F., and SISLER, F.: *ibid.* 152, 479 (1944)
- (11) SWANSON, M. A., and CORI, C. F.: *ibid.* 172, 815 (1948)
- (12) SOMOGYI, M.: *ibid.* 160, 61 (1945)
- (13) CORI, G. T., CORI, C. F., and SCHMIDT, G.: *ibid.* 129, 629 (1939)
- (14) CORI, G. T., and CORI, C. F.: *ibid.* 131, 397 (1939)
- (15) CORI, G. T., and CORI, C. F.: *ibid.* 133, 733 (1940)
- (16) BERNFELD, P., and MEUTÉMEDIAN, A.: *Nature*, 162, 297, 618 (1948)
- (17) PEAT, S., et al.: cf., *J. Chem. Soc.*, 877, 882 (1945), 1705, 1712 (1949), 84, 93 (1953); *Nature*, 161, 127 (1948)
- (18) BALLS, A. K., WALDEN, M. K., and THOMPSON, R. R.: *J. Biol. Chem.*, 173, 9 (1948)
- (19) PORTER, H. K.: *Biochem. J.*, 45, xxxvii (1949)
- (20) 井上, 小野寺: 化研講., 16, 28 (1947)

Summary.

Phosphorylase activity could not be detected in sweet potato or barley extract where β -amylase activity was high. The mechanism of the inhibition of phosphorylase activity by β -amylase was found to be due to the destruction of added soluble starch as an activator by the action of β -amylase. To demonstrate directly the presence of phosphorylase in the sweet potato extract, it was attempted to purify phosphorylase from the sweet potato extract by means of ammonium sulphate. A preparation active in phosphorylase but with little β -amylase activity was obtained.

澱粉の生成及び分解に關する酵素化學的研究

(第 7 報) Amylosynthase と Amyloglucosidase との關係に就て*

丸尾文治, 小林恒夫 (東京大學農學部農藝化學教室)

昭和 25 年 6 月 19 日 受理

Studies on the Enzymic Formation and Degradation of Starch. Part 7.
Amylosynthase and Amyloglucosidase.

By Bunji MARUO and Tsuneo KOBAYASHI (Dept. of Agr. Chem., Univ. of Tokyo)

前報⁽¹⁾に述べた如く著者等は糯米澱粉に amylosynthase が作用して生ずる多糖類が種々の點に於て amylose 類似のものであることを明かにした。又 amylosynthase は β -amylase による限界 dextrin に働いて再び β -amylase の作用を受けるように變化させることを見出した。これらの事實から著者等は amylosynthase の作用は分枝せる glucoside 鎖の分枝點を分解して直鎖狀 glucoside を生ぜしめるものであろうことを推論した。しかしながら限界 dextrin (本報では専ら β -amylase の作用した後に残る限界 dextrin のみを問題にする) に働く酵素として K. H. MEYER 等は酵母抽出液中に α -glucosidase なるものを報告している⁽²⁻³⁾。従つて限界 dextrin に對する作用に關聯して、この酵素と amylosynthase との關係が問題になるので本報ではこの點につ

* 本報告は 1949 年 4 月 10 日 日本農藝化學會學術講演會にて講演したものの一部である。

いて述べる。

MEYER は限界 dextrin (彼の限界 dextrin I) に酵母から抽出した酵素を作用させると、限界 dextrin の最外側の分枝点 (α -1,6-glucoside 結合) が分解されて限界 dextrin II となり、再び β -amylase で分解されるものになると考え、この酵素を α -glucosidase (amyloglucosidase) と命名している (Fig 1, a 参照)。一方 amylosynthase は糯米澱粉の赤色ヨード反応を青色に變える作用と共に、限界 dextrin に對する作用をも有している。この作用は著者等の作用模式に従えば何れも glucoside 鎖の分枝点を分解することによつて行われるものである。(Fig 1, b 参照)

Amylopectin or
Glutinous rice starch

Fig. 1. The Schema of Starch Degradation by Enzymes.

用してそのヨード反応を青變せしめる。(MEYERはこの酵素の作用に際してヨード反應の變化には餘り注意を拂わなかつた)。又 amylosynthase 溶液から糯米澱粉のヨード反應を變える因子と、限界 dextrin に働く因子を分離せんとしたが未だ成功せず、この2つの作用は常に隨伴している。これらの諸點から考えてこの2者はむしろ同一の酵素ではないかとも思われる。この點は更に検討を要するのであるが、現在の所ではこの可能性が極めて大きい。もしそうであるならば限界 dextrin に對する作用は MEYER の考えた如く最外側の分枝點のみを分解するものではなく、著者等の考えたように内側の分枝點をも分解して amylose 様の glucoside 鎖を生ずるのであろう。實際 MEYER は彼の限界 dextrin II についてその分子量その他の諸性質を檢討しておらず、これが果して彼の云う如く限界 dextrin I の最外側の分枝點がとれただけのものであるか否かは甚だ疑問である。この點に關してむしろ著者等の見解を支持すると思われる二、三の事實がある。

SCHOCH は澱粉質多糖類の溶液を butanol で處理すると amylose の如き直鎖狀のものだけが結晶狀に沈澱することを見出し、これを amylose と amylopectin の分離に應用した⁽⁴⁾。糯米澱粉、限界 dextrin は直鎖狀成分を含まないから、SCHOCH の方法により butanol で處理しても勿論沈澱は生じない。ところがこれらの多糖類に amylosynthase をしばらく作用させたものは、butanol 處理で沈澱を與え、この沈澱は顯微鏡で觀察すると KERR, SEVERSON⁽⁵⁾ による結晶 amylose に類似のほゞ結晶と見なし得るものである。このことは amylosynthase の作用による生成物が amylose 類似のものであるとする著者等の見解⁽¹⁾を裏書きするものであるが、更に MEYER の方法⁽³⁾による amyloglucosidase 液を限界 dextrin に作用させたものも butanol により沈澱を與える。これは限界 dextrin II が MEYER の考えたような構造のものでなくて amylose 様のものなることを示している。

次に各種多糖類に對する酵母抽出液の作用について考察する。Amylose, amylopectin, 限界 dextrin, glycogen 等各種の多糖類の溶液に酵母抽出液を作用させると徐々に還元力を生じ、その量は各多糖類の末端基の量に大體比例する⁽⁶⁾。酵母液中には通常の意味の amylase は存在しないと云われ⁽⁶⁻⁷⁾、又は酵母 amylase は抽出が極めて困難であるとされている⁽⁸⁾から(從來酵母 amylase と稱されたものの中には實は phosphorylase, phosphatase の混合系を扱つたものも多い)、この作用は一種の α -glucosidase が非還元性末端基から順次分解を行うとも考えられるが、それだけで説明できない所がある。即ちこの際 glycogen, 限界 dextrin 等分枝の多い多糖類では還元力を生ずると共に、比較的短時間の中に作用液が白濁して来る。これは糯米澱粉に amylosyn-

thease を作用させた時ヨード反應の青變と共に白色沈澱を生じ、又徐々に還元力を生ずると同一の現象である。これらの事實はこの際やはり amylosynthase が作用しており、これが限界 dextrin をも含めて一般に分枝せる glucoside 鎖を分解するとすれば簡単に理解し得る。

以上述べた理由から考えて K. H. MEYER 等の amyloglucosidase と amylosynthase は恐らく同一の酵素であり、その作用は著者等の考えた如きものではないかと推論される。

實 験 の 部

1. 限界 dextrin に對する Amylosynthase の作用： Amylosynthase 溶液はビール酵母より、限界 dextrin は馬鈴薯又は糯米澱粉に甘藷 β -amylase を作用させて前報⁽¹⁾の如く製した。限界 dextrin 溶液に醋酸鹽緩衝液 (pH 6.2) を加えて 20°C で amylosynthase を作用させ、HANES 法で還元力を測定すると徐々に還元力の増加が見られる。この際溶液は次第に不透明となり遂に白色沈澱を生ずる。糯米澱粉からの限界 dextrin (ヨード反應赤色) を用いた時はそのヨード反應が紫乃至青紫色に變化する。一旦煮沸して酵素作用を止めた後甘藷 β -amylase を加えると速に糖化が起り前報に記載した如き曲線を得る。

2. 限界 dextrin 及び糯米澱粉に對する Amyloglucosidase の作用： Amyloglucosidase 溶液は MEYER の方法⁽³⁾によつて次のようにして調製した。乾燥ビール酵母 20 g に 60 cc の水を加えて 35° で 3 時間抽出し、粘々した塊をセロファン膜に包んで 0° の蒸溜水に對して 45 時間透析した後、遠心分離して透明液を得る。次の操作はすべて 0~3° にて行ふ。液に 2 N NaOH を滴下して pH 7.8 とし、次いで 1 N 醋酸で pH 6.7 にもどすと間もなく沈澱を生ずるから遠心分離して捨てる。上澄液に 1 N 醋酸を加えて pH 5.3 とすると沈澱を生ずるから遠心分離して沈澱と溶液 A を分ける。沈澱を 0.2 M 醋酸ソーダ 15 cc と共にすりつぶし、同時に 0.5 N NaOH を滴下して pH 6.9 とする。10 分間すりつぶした後、不溶物を遠心分離してやや濁つた上澄液を 20 cc にうすめる (劃分 I)。溶液 A (53 cc) を 2 N NaOH にて pH 6.9 とし、0° の飽和硫酸溶液 (豫め pH 6.9 にしておく) 125 cc を加えて 15 分後遠心分離して沈澱を集める。沈澱に少量の水を加え、0.5 N NaOH で pH 6.7 にし、不溶物を遠心分離して得た透明液を 20 cc にうすめる (劃分 II)。

かくして得た酵素液は amyloglucosidase の他に、phosphorylase 及び BERNFELD 等⁽⁴⁾が後に isophosphorylase と名付けたものをも含んでいるが、劃分 II は比較的 amyloglucosidase が強く磷酸鹽を添加しなければ加磷酸分解は餘り起らないから、以下の實驗には多くはこの劃分を用いた。

この酵素液の限界 dextrin に對する作用は前項のものと同様であつて、この dextrin を再び β -amylase の作用を受けるように變化させた。又この酵素液は糯米澱粉にも作用して還元力の増加を起すと共にそのヨード反應を青紫色に變えた。その試験の 1 例を Table 1 に掲げる。比較の爲に上述の amylosynthase 液を同程度の還元力を生ずるよううすめて用いた結果を併記するが、何れも glucose として 5 % 程度の還元力を生じた頃にヨード反應は紫色となつて、還元力とヨード反應は兩酵素とも並行して變化した。尙 pH 5.6 以下にした場合はヨード反應は變化しなかつたが、還元力の出現も亦僅かであつた。

Table 1. Degradation of Glutinous Rice Starch by Amylosynthase and Amyloglucosidase.

Time (hr.)	Amyloglucosidase		Amylosynthase	
	%Conversion	Iodine color	%Conversion	Iodine color
0	0.0	red	0.0	red
24	5.81	violet	4.74	violet
96	9.85	blue-violet	9.03	blue-violet

Reaction conditions : 1% solution of LINTNER soluble starch from glutinous rice starch
20 cc + 0.1 N acetate buffer (pH 6.2) 2 cc + enzyme solution 2 cc. Temperature : 20°C.

Reducing values were determined with HANES' method and calculated as glucose.

3. 限界 dextrin 分解物の SCHÖCH 法による試験： 限界 dextrin 及び糯米可溶性澱粉に上述の如く兩酵素液を作用させて 4~5 日おいたものを煮沸して酵素を破壊すると共に生成物の沈澱を溶かし、ガラス漏斗で濾過した後アルコールを 60% に加えて沈澱させる。これを熱水に溶解して約 3 % 溶液とし、SCHÖCH の butanol 沈澱法の簡略法⁽⁴⁾によつて試験した。即ちこの溶液に過剰の butanol を加え、時々攪拌しつつ沸騰湯煎上で 6 時間加熱し徐々に冷却する。2~3 日放置して沈澱の生成するか否かを觀察した。對照として豫め 85% メタ

ノールで脱脂した限界 dextrin 及び糯米可溶性澱粉を同様に処理したが沈澱は生じなかつた。これらに酵素を作用させたものは沈澱を生じ, amylose 類似のものが生成したことを示した。

Table 2. Precipitation of Enzyme-treated Polysaccharides with Butanol

Polysaccharides	Precipitation with butanol
Soluble glutinous rice starch (A)	—
A, after the action of amylosynthase	+
A, after the the action of amyloglucosidase	+
Limit dextrin (B)	—
B, after the action of amylosynthase	+
B, after the action of amyloglucosidase	+

(LINTNER 法), 限界 dextrin, glycogen (武田製, 化学用) である。これらを何れも約 1% 溶液とし, その一部について鹽酸加水分解後の glucose を定量して濃度を厳密に決定しておく。この溶液 20 cc に 0.1 N 醋酸鹽緩衝液 (pH 6.2) 3 cc, 及び酵素液 2 cc を加え, トルエンを添加して 20° に放置する。一定時間後に一定量づつ取出して HANES 法により還元力を測定し, 同時にヨード反應, 及び溶液の外観を觀察した。結果は Fig. 2

Fig. 2. The Action of Amylosynthase on Various Polysaccharides of Starch-Series.

Reducing values were determined by HANES' method and calculated as glucose.
1 : limit dextrin 4 : soluble starch
2 : glycogen 5 : amylopectin
3 : soluble glutinous rice starch 6 : amylose

Table 3. The Changes in Iodine Color and Appearances of the Solutions of Various Polysaccharides owing to the Action of Amylosynthase

Polysaccharides	at once		after 1 day		after 3 days		after 7 days	
	iodine color	appearance	i.	a.	i.	a.	i.	a.
Potato amylose	B	L	B	L	B	L	BV	ST (slightly retrograded)
Soluble starch	B	L	B	L	B	L	B	T (a little precipitate)
Potato amylopectin	V	ST	V	T	V	T	B	T
Glutinous rice starch	R	L	V	L	V	T	B	T (large amount of precipitate)
Limit dextrin	V	ST	V	ST	V	T	B	M (large amount of precipitate)
Glycogen	Br	ST	R	T	RV	M	V	M (a little precipitate)
B : blue BV : blue-violet V : violet RV : red-violet R : red								
Br : brown L : limpid ST : slightly turbid T : turbid M : milky								

生じたことを示す。

4) 分枝度, 従つて末端基含量の異なる各種多糖類に酵母 amylosynthase を作用させると徐々に還元力を生じ, その量は分枝度に大體比例する。同時にヨード反應は褐色→赤色→青色の方向に變化する。

5) 以上の事實から著者等は amylosynthase と amyloglucosidase は恐らく同一の酵素であつて, glucoside

4. 各種多糖類に對する酵母抽出液の作用: 主として α -1,4 glucoside 結合から成り種々分枝度の異なる數種の多糖類について酵母抽出液 (amylosynthase 液) の作用を試験した。用いた試料は馬鈴薯 amylose, 馬鈴薯 amylopectin (SCHÖCH 法)⁽⁴⁾, 可溶性澱粉 (市販の化学用), 糯米可溶性澱粉

及び Table 3 の如くであり, 分解率は分枝度に大體比例した順序に大となつた。amylopectin と可溶性澱粉の分解率が分枝度と逆になつたのは, amylopectin 溶液の分散不充分の爲と考えられ, 又限界 dextrin が最も分解率大となる理由としてはその最外側の分枝點が他のものに比して分解されやすい状態にあるからと考えられる。ヨード反應は分枝成分は何れも褐色→赤→青の方向に變化し, 又沈澱も多量に生じた。

總 括

1) Amylosynthase と K.H. MEYER の amyloglucosidase は共に限界 dextrin に作用してこれを再び β -amylase で分解される形に變化させる點で同様の作用を有している。

2) Amylosynthase は糯米澱粉に働いてそのヨード反應を青變させるが MEYER の方法による amyloglucosidase 液も同様の作用を有し, その他の性質も類似している。

3) 限界 dextrin に兩酵素を作用させて得た生成物は SCHÖCH の Butanol 法で沈澱を與え, amylose 型のものが

鎖の分枝点を分解して amylose 型の多糖類を生ずるものであることを推論した。

終りに本研究に際し御指導を賜った後藤格次、松山芳彦兩先生に深甚なる感謝の意を表する。

- (1) 丸尾, 小林: 農化, **23**, 115, 120 (1949)
- (2) K. H. MEYER, P. BERNFELD: *Helv. Chim. Acta*, **23**, 875 (1940)
- (3) K. H. MEYER, P. BERNFELD: *ibid.*, **25**, 399 (1942)
- (4) T. J. SCHUCH: *J. Am. Chem. Soc.*, **64**, 2957 (1942)
- (5) R. W. KERR, G. M. SEVERSON: *ibid.*, **65**, 197 (1943)
- (6) K. H. MEYER, P. BERNFELD: *Helv. Chim. Acta*, **24**, 1400 (1941)
- (7) K. SJÖBERG: *Z. Physiol. Chem.*, **162**, 223 (1927)
- (8) A. GOTTSCHALK: *ibid.*, **153**, 215 (1926); **173**, 139 (1929)
- (9) P. BERNFELD, A. MEUTÉMEDIAN: *Nature*, **162**, 297, 618 (1948); *Helv. chim. Acta*, **31**, 1724, 1735 (1948)

SUMMARY

Relationship between α -glucosidase (amyloglucosidase) of K. H. MEYER and amylosynthase was discussed. These two enzymes are very similar as to the action on the limit dextrin. Reaction products from limit dextrin and glutinous rice starch produced by these enzymes were tested by SCHUCH's butanol precipitation method, and were proved to be amylose-type polysaccharides. The authors are of the opinion that these two enzymes are identical and that their action consists in the breakdown of the branching points of α -glucosidic chains. The actions of amylosynthase upon the various polysaccharides of starch-series were also discussed.

クロウメドキ樹皮成分の研究 (第 12 報) ソリゲニン類縁物質の合成

八 木 一 文 (大阪大学産業科学研究所)

昭和 25 年 6 月 23 日 受理

Studies on the Components of the Bark of *Rhamnus japonica*

Part 12. Synthesis of the Compounds Relating to Sorigenin

By Kazufumi YAGI (Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University)

綜 論

クロウメドキ樹皮に含有される 2 種の新配糖體は二國教授によつて次の如く構造が決定された⁽¹⁾。

Fig. 1.

著者は之等の物質の合成を企圖し、その合成計畫の手がかりを作る爲、先ずその母核であるナフタリンのラクトン及び之に水酸基 1 ケを有するものの合成を試み、その目的を達成することが出来たので茲に報告する。

母核物質である 3-hydroxymethyl-2-naphthoic acid のラクトンは、1929 年 I. G. Farbenindustrie A.-G. の Fritz MAYER 等により下の方法で合成され驅蟲作用を有すると報告されている⁽²⁾。

Fig. 2.

著者はこの方法を追試したが、第一段階の電解還元反應で何等反應成績體を捕捉することが出来なかつた。そこで下の如く、2,3-naphthalene-dicarboxylic acid anhydride⁽³⁾から出發して得られる *o*-dialdehyde の分子内 CANNIZZARO 反應を利用する方法⁽⁴⁾を試み、所期の目的を達することが出来た。