- Med., 4, 589 (1929); cf. C. A., 24, 653 (1930).
- (7) WAGNER, O.: Z. Immunitäts., 84, 225 (1935); cf. C. A., 29, 8116 (1935).
- (8) OLIVER-GONZALES, J.: J. Infectious Diseases, 79, 221 (1946); cf. C. A., 41, 7500 (1947).
- (9) MAZZOTTI, L.: Rev. Inst. Salubridad y Enferm. Trop., 9 (4), 257 (1948); cf. Biol. Abst., 23, 2500 (1949).
- (10) 東 胤弘, 杉本正勝, 滝口頼之: 日獣医雑誌, 12, 120 (1950). 講演抄録.
- (11) SZAFLARSKI, J. et NAWROCKI, J.: Biol. Abst., 25, 2761 (1951).
- (12) 小野 豊, 磯田政恵: 畜産の研究, 6, 559 (1952).
- (13) STEPHENSON, WM.: C. A., 41, 6994 (1947).
- (14) MAEKAWA, K. KITAZAWA, K. et KUSHIE M.: Compt. rend. seau. Soc. Biol., 148.

Résumé

La recherche sur la substance allergénique ne semble jamais avoir été envisagée. Voilà pourquoi nous nous consacrons à la purification de l'allergen.

Au début, un homogénat de *Fasciola hepatica* (FH) était extrait avec de l'eau distillée, et un extrait brut était précipité de la solution par le sulfate d'ammonium. On extrayait ensuite l'allergen précipité avec du phenol, et le faisait précipiter à nouveau de celui-ci avec de l'alcool. Afin de purifier de plus, le produit brut absous dans une solution diluée d'ammoniaque ou d'acide acétique était précipité à plusieurs reprises par fractionnement soit au pH soit à l'alcool. Après avoir soumis ce dernier extrait à une dialyse, en l'essuyant au vide dans un dessiccateur, nous obtenions à la forme cristalline une substance responsables des actions allergéniques à la fascioliasis. Environ 30% de cette substance cause l'enflure et la raideur à la racine intérieure de la queue du boeuf qui avait le FH par l'injection sous-cutanée.

Le produit est soluble dans le phenol, l'acide acétique et l'ammoniaque, mais soluble à peine dans l'eau, et insoluble dans les autres solvants organiques. Par électrophrèses, sa homogénéité était témoinnée. Il ne montre pas un sûr point de fusion (se décomposé à 213~5°). $[\alpha]_D^{18} = -71.16^\circ$ dans l'eau. $\lambda_{\max} = 274 \text{ m}\mu$. Il fait voir les réactions de ninhydrin, biuret, et Molisch.

β -アミラーゼのアスコルビン酸に依る阻害に 関する研究 (第4報)* H_2O_2 の影響

伊藤正春, 安部道夫 (東京農工大学農学部)

昭和29年1月11日受理

Inhibitory Effect of Ascorbic Acid on β -Amylase. Part 4. Effect of H_2O_2

By Masaharu ITÔ and Michio ABE

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

著者は本阻害の中、不可逆型の部分の機構について第1報⁽¹⁾に於て、アスコルビン酸の自酸化の産物特に H_2O_2 によるものではないかと推論したが、その後第3報⁽²⁾に於て、自酸化の産物による阻害も主として終の段階には考えられるが、不可逆型阻害の主要部分としては考え難い事を述べた。然し H_2O_2 の影響については、実際にそれを見る必要があり、その意味で本報に於ては、 H_2O_2 による β -amylase の不活性化、及びアスコルビン酸による阻害に対する H_2O_2 添加の影響について検討した。その結果は第3報の結論と同じく、 H_2O_2 は不可逆型阻害の主要部分としては考えられないが、これに対して促進的效果を持つ事が明かになり、ここで一応阻害全体の機構に関する考察を試みた。以下その実験の結果について述べる。

I-実験方法及び実験結果

酵素の処理は 0.03 M acetate buffer, pH 5.6, 2~3° に於て既報に準じて行つた。 H_2O_2 は市販の3%のものを減圧蒸溜によつて安定剤を除いて使用した。

1. H_2O_2 による β -Amylase の不活性化 H_2O_2 が β -amylase にどのような阻害効果を持つか、 Cu^{++}

* 本報告の要旨は 1953 年 5 月 30 日 第137回日本農芸化学会関東支部講演会に於て発表した。

の存在が影響するか, cysteine により恢復するかを検した結果が Fig. 1 である。H₂O₂ は β -amylase を不活性化するが, ある rate を持つており, 濃度の影響が少く, 比較的阻害力に乏しい。温度の上昇は不活性化を促進するが, 0.5 μ M の Cu⁺⁺ の存在は殆ど影響はない。Cysteine によつては如何なる段階に於ても reactivation は起らなかった。

Fig. 1. Time course of inactivation of β -amylase by H₂O₂.

Δ $5 \times 10^{-6} M$ H₂O₂ at 2~3°
 $\circ$ $5 \times 10^{-5} M$ H₂O₂ and pH 5.6
 $\square$ $5 \times 10^{-5} M$ H₂O₂ plus $5 \times 10^{-7} M$ Cu⁺⁺
 $\bullet$ $5 \times 10^{-4} M$ H₂O₂ at 20° ± 0.1° and pH 5.6
 No reactivation by cysteine was observed at any stages.

Fig. 2. Effect of added H₂O₂ on the inhibition of β -amylase by ascorbic acid. (no added Cu⁺⁺)

1 Δ $5.7 \times 10^{-4} M$ (0.2 mg per 2 ml) ascorbic acid
 2 $\circ$ $5.7 \times 10^{-4} M$ ascorbic acid plus $5 \times 10^{-5} M$ H₂O₂

H₂O₂ was added immediately after inhibition treatment with ascorbic acid.

2. アスコルビン酸阻害に対する H₂O₂ の影響 (Cu⁺⁺ を加えない場合) 次に, アスコルビン酸による阻害と H₂O₂ による阻害とが相加的に出るか否かを検した結果が Fig. 2 である。H₂O₂ は既報の阻害処理の直後に Fig. 2 に示した濃度になるように加えた。H₂O₂ はアスコルビン酸に対して極めて徐々に作用し, 酵素に対する阻害は定性的の意味で相加的に起る。

3. 銅-アスコルビン酸阻害に対する H₂O₂ の影響 アスコルビン酸の自酸化の結果集積する H₂O₂ は不可

Fig. 3. Effect of added H₂O₂ on the inhibition of β -amylase by ascorbic acid plus Cu⁺⁺. (Cu⁺⁺: 0.5 μ M per litre, ascorbic acid: 0.2 mg per 2 ml)

1 $\bullet$ $5.7 \times 10^{-4} M$ ascorbic acid (no added H₂O₂)
 2 Δ " plus $5 \times 10^{-5} M$ H₂O₂
 3 $\circ$ " plus $2.8 \times 10^{-4} M$ H₂O₂
 4 $\square$ " plus $7 \times 10^{-4} M$ H₂O₂

Experimental procedures were the same as shown in Fig. 3 in Part 2 of this series. (pH 5.6 and 2~3°). Dotted lines indicate the degree of reactivation in each stage of inhibition.

逆型阻害の主要部分ではないにしても、何等かの影響を持つ事が考えられるので、実験 2 と同じ方法でかなり広い濃度範囲の H_2O_2 を加えてその影響を検した結果が Fig. 3 である。ここで認められる事実を次に示す。

- i) H_2O_2 はたといアスコルビン酸に対して過剰に存在しても、本報の条件下 (pH 5.6, 2~3%) では極めて徐々にしかアスコルビン酸と反応しない。
- ii) 阻害処理直後の mercaptide 型阻害は H_2O_2 の添加によって認め得べき影響を受けない。
- iii) H_2O_2 はアスコルビン酸の自酸化に対して促進効果を持つ結果、mercaptide 型阻害の終結を早くする。
- iv) H_2O_2 は不可逆型阻害に対して促進効果を持ち、これと iii) の総合結果として、 H_2O_2 の濃度の大きい程阻害曲線の極大の起る時期は早く、その高さは低い。

II. 考 察

本報では主として不可逆型の部分の機構について考察を加える事とする。

1. 既報の結果からの考察 a). 著者はこの部分は酵素の SH 基に起つている不可逆変化 (恐らく酸化) であつて、mercaptide 型阻害に続いて起るものと考え、即ち、第 1 報の 2 つの型の阻害が同じ基に parallel に起るとする考えよりは、第 3 報の series に起るとする考えの方が実験の結果 (主として第 3 報) を良く説明出来る。

この部分が酸化であるとする事は、アスコルビン酸の還元性にのみ注目すると甚だ奇異にとれるが、その理由は次の 2 点にある。

b) この部分が酸素の供給が少いと軽くなる (第 3 報, 実験 1, 2 参照)。若し mercaptide 型 $\rightarrow$ 不可逆型の変化が無酸素的に起るものならば、既報のように mercaptide 型阻害の継続は嫌気的条件の方が永いのであるから、事実は逆にならねばならない。

c) ENGLARD 等⁽³⁾ は甘藷 β -amylase の *c*-iodosobenzoate による酸化の場合、化学的処理によつては全く reactivate されない事を述べており、本報の実験 1 の結果と共にこの点で urease⁽⁴⁾⁽⁵⁾ や、特に papain⁽⁶⁾ の場合と明かに異つている。

更にこの酸化については

d) 末期の阻害度に対する Cu^{++} 濃度の影響の少い事 (第 1 報の実験 4 の vi) 参照) から考えて、恐らくこれは Cu^{+} と SH 基との結合が離れて行われるものである。従つてこの際、1 個の Cu^{++} はアスコルビン酸の存続する限り何回も mercaptide の形成に与る事が考えられる。

e) 阻害曲線の極大極小を説明するには、cuprous mercaptide がすべて不可逆型に移行するのではなく、 Cu^{+} の減少に伴つて free の SH 基に戻る変化と、活性化されて不可逆型に移行する変化の両方が存在すると考えなければならない。

以上のように考えると、この阻害は分子の大きさこそ異なるが、MICHAELIS⁽⁷⁾ による Fe^{++} 存在下の cysteine の自酸化の機構に似たものになる。(Cysteine, glutathione と Cu^{++} の場合も恐らく同様の機構が存在するものと考えられるが文献については未詳) ただ、本阻害と cysteine の場合との相違は、前者に於てはアスコルビン酸の介在を必要とする点である。Urease の場合、微量の重金属の混入が保存中の酵素の不活性化を招来する事が知られており⁽⁸⁾、 β -amylase の場合も同様の事が考えられるが、少くとも 3~4 日位では Cu^{++} と酵素のみでは著しい変化は認められなかつた (第 1 報, Fig. 7 参照)。

2. H_2O_2 添加の影響について 実験 1 の結果を既報の銅-アスコルビン酸阻害の不可逆型の部分 (第 2 報 Fig. 3, 4 参照) と比較すると、 H_2O_2 による阻害は遙に軽く、アスコルビン酸の自酸化に際して集積すると考えられる H_2O_2 の濃度 (アスコルビン酸濃度の 1/5~1/10 程度) を以てはこの部分を説明することは到底出来ない。然し、実験 2, 3 の結果は何れも H_2O_2 添加の影響がアスコルビン酸による阻害に対して促進的になる事を示している。この点について著者は、この影響が間接的なもの (例えば、 H_2O_2 がアスコルビン酸に作用して何等かの product が出来、更にこれが酵素に作用するような場合) ではなく、次の 2 つの効果によるものと考え、

第 1 は cuprous mercaptide に対するものである。上述の MICHAELIS の説によると cysteine の自酸化に際して集積する H_2O_2 は、 O_2 と同格で再び反応連鎖に加わる事が示されている。実験 3 の iii), iv) の事実が既

報の酸素圧の減少の影響 (第 3 報, 実験 1, 2 参照) の逆である事は, Fig. 3 の H_2O_2 添加の効果の相当初期 (例えば 3 hrs. あたり) の部分は mercaptide に対するものと考えた方がよい。

第 2 は free の SH 基に対するもので, これは実験 1 の結果から, 又末期程 mercaptide が減少する事から考へて, Fig. 3 ではアスコルビン酸がかなり減つてから後に著しいものと思われる。Fig. 2 の曲線 1, 2 の差がこの何れであるかに関しては, 恐らく第 2 の効果であろう。即ち, H_2O_2 による free の SH 基の酸化はアスコルビン酸の存在下に於ても行われるものと考える。

3. 阻害全体の機構について Cu^{++} 存在下のアスコルビン酸の自酸化に際して H_2O_2 が集積し, これがアスコルビン酸の自酸化の主として末期の速度に影響することは文献⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ にも示されており, H_2O_2 とアスコルビン酸との反応が極めて徐徐である事は実験 2, 3 の結果にもうかがわれる。この H_2O_2 の集積は本阻害に於て考察 2 に示したのと同じ効果を持つ事が考えられるので, 著者は阻害全体の機構について一応次のように 3 段階に分けて考へて見た。

第 1 段階: Cuprous mercaptide の生成で, これに関しては既報の通りである。

第 2 段階: Cuprous mercaptide が Cu^{+} の減少に伴つて free の SH 基に戻る変化と, 一方不安定な cuprous mercaptide が O_2 の存在で酸化的 intramolecular rearrangement を行つて不可逆型阻害に移行する変化の両方が行われる。後者の機構は MICHAELIS による cysteine の自酸化の機構と型式の点では似たものと思われ, 結果としては誘導酸化 (induced oxidation) である。(この際, アスコルビン酸は inductor であり, 酵素は acceptor となる。) 集積する H_2O_2 はこの反応に対して酸素圧を上げるのと同じ促進効果を持つ。但し, H_2O_2 の起源がアスコルビン酸にある事は cysteine の場合と異なる。

第 3 段階: 集積する H_2O_2 によつて残つた free の SH 基が酸化を受けて不可逆型阻害に移行する。この部分が H_2O_2 によるものである事は, 第 3 報の Fig. 2 の曲線 5, Fig. 3 の曲線 3 を本報の Fig. 1 と比較した時, H_2O_2 濃度と rate の点で甚だしい矛盾が起らない事から妥当なものと考えた。

上記の第 2, 第 3 段階の変化の結果は同じであるから判然と区別する事は不可能であるが, 前者は阻害処理開始直後から mercaptide 型阻害の消失まで続くがむしろ初期に著しく, 後者は逆にアスコルビン酸が相当減少してから後に著しいものと思われる。

以上の様に考えると既報のすべての結果を一応説明出来る。然し, MAFSON⁽¹²⁾ は urease の場合に dehydroascorbic acid は酵素に対して毒性はないが, 2,3-diketo-L-gulonic acid が Cu^{++} 存在下に於てのみ毒性を示す事を述べており, 本阻害の場合にも更にこのような因子が加わっているか否かについては明かでない。

Cu^{++} を添加しない場合の緩慢な activity の低下については, 上記機構の中第 3 段階をあてはめる事は無理であつて, 第 1 段階として検出不能の極微量の Cu^{++} によつて第 2 段階の誘導酸化の部分のみが徐徐に行われているものとして説明出来る。即ち, 恢復曲線の形状がアスコルビン酸の自酸化曲線に似ている事実 (第 2 報, 実験 2 の iii), 同報 Fig. 3 参照) は product の集積によるものではなくて誘導酸化に帰すべきものと考えられる。

(摘要は英文参照)

終りに臨み, 本研究に当り御指導を頂いた東京大学佐橋佳一教授, 丸尾文治助教授, 並びに有益な御助言を頂いた東大生物化学教室中村道徳氏に感謝する。尙, 研究費の一部は昭和 27 年度文部省科学研究助成補助金によるもので茲に記して謝意を表する。

訂 正 本研究, 第 2 報 (農化, 27, 762 (1953)) の Fig. 4 のアスコルビン酸の自酸化曲線の番号が, 上から 1, 2, 3, とあるのは 3, 2, 1 の誤に付茲に訂正する。

- (1) 伊藤正春, 安部道夫: 農化, 27, 436 (1953).
- (2) 伊藤正春, 安部道夫: 農化, 28, 15 (1954).
- (3) ENGLARD, S., SOROF, S., and SINGER, T. P.: *J. Biol. Chem.*, 189, 217 (1951).
- (4) HELLERMAN, L., et al.: *ibid.*, 147, 443 (1943).
- (5) SUMNER, J. B.: "The Enzymes", Academic Press, Inc., New York, Vol. 1, Part 2, p. 883 (1951).

- (6) HATA, T., and MATSUSHITA, S. *Memoires of the Res. Inst. for Food Sic.*, Kyoto Univ., No. 5, 65 (1953).
- (7) MICHAELIS, L.: "The Enzymes", Vol. 2, Part 1, p. 43 (1951).
- (8) SUMNER, J. B.: *ibid.*, Vol. 1, Part 2, p. 882 (1951).
- (9) 伊藤正春, 安部道夫: 農化, 27, 762 (1953).
- (10) DEKKER, A. O., and DICKINSON, R. G.

- J. Am. Chem. Soc.*, 62, 2165 (1940). (12) MAPSON, L. W. : *Biochem. J.*, 40, 240
 (11) WEISSBERGER, A., and LU VALLE, J. (1946).
 E. : *ibid.*, 66, 700 (1944).

Summary

1. In order to elucidate the mechanism of the inhibition of sweet potato β -amylase by ascorbic acid, inactivation of β -amylase by H_2O_2 and the effect of H_2O_2 on the inhibition by ascorbic acid were examined. (Fig. 1~Fig. 3)

2. From the results shown in figures 1 to 3 and those previously reported, the most probable mechanism of the inhibition of β -amylase by ascorbic acid plus Cu^{++} was proposed as follows.

First step. Essential-SH groups of enzyme combined rapidly with Cu^{++} formed by ascorbic acid.

Second step. As ascorbic acid decreases, cuprous mercaptides returned partly to free -SH groups and thus the enzyme restored its activity, but another (activated) parts of mercaptides underwent an intramolecular rearrangement by atmospheric O_2 to become inactive disulfide form. In this oxidation reaction, H_2O_2 accumulated during the course of autoxidation of ascorbic acid might serve in the same way as O_2 . The change in this step was an "induced oxidation", since no appreciable inactivation occurred by Cu^{++} alone, and the mechanism might have some analogy to that of the autoxidation of cysteine in the presence of Fe^{++} in MICHAELIS' theory.

Third step. From relatively later stage of autoxidation of ascorbic acid, the remaining -SH groups are oxidised directly to disulfide form by H_2O_2 accumulated.

3. The feeble inactivation by ascorbic acid alone (Curve 1 in Fig. 2) can only be understood as the change in the second step of the above mechanism.

緑葉中に於ける同化澱粉の分解機構 (第 4 報)

甘藷葉より抽出した saccharogenic activity を主とする

酵素系のアミロースに対する作用*

馬 場 明 (滋賀県立農業短期大学農芸化学教室)

昭和 29 年 1 月 12 日 受理

Enzymic Degradation of Assimilation Starch in Green Leaves. Part 4. Action of Partially Purified Saccharogenic Enzyme System of Sweet Potato Leaves on Amylose.

By Akira BABA (Shiga Agr. College)

著者等⁽¹⁾は予報において、甘藷葉の amylase が殆ど純粋な β -amylase であろうと考察したが、Table 1 の如く調製した酵素液を可溶性澱粉に作用させると、反応液のヨード呈色が紫のまま、生成糖をグルコースとして計算した分解率が約 60% に達し、アミロースに作用せしめると、実験の部に示す如く 100% 近くになり、純粋な β -amylase による分解率を遙かに突破する。

従来、高等植物には amylase 及び maltase が広く分布することが知られている⁽²⁾ ので、葉より調製した酵素液中に amylase と maltase を含むと考えれば上記の現象が無理なく理解される (但し著者は未だ甘藷の maltase 作用に就ての記載を見ない)。然しながら PHILLIPS 等⁽³⁾の "Gluc amylase", 北原等⁽⁴⁾の " γ -amylase" の如く澱粉より直接グルコースを生成する酵素の存在も提唱され、甘藷葉中にかかる酵素が存在すると仮定しても上記のような現象が見られると思われる。勿論これらの酵素は糸状菌に見出されたものであるが、高等植物に全然存在しないという積極的な証明がないので、この点を検討するため以下の実験を行つた。また下記のデータに見られる如く甘藷塊根の粗酵素液に麦芽の結晶 α -amylase を添加し、これをアミロースに作用せしめても、其の分解率は約 45% (生成糖をグルコースとして) に過ぎず、しかも葉の酵素の作用に比べると比較的速かに分解限度に達する。このこともまた上記の如く gluc amylase 系酵素の有無の検討を要すると考えた理由の

* 1953-8-9 北海道大学に於ける日本農芸化学会臨時大会に於て講演した。