研究費により行った事を附記し感謝の意を表します。

(1) 玉利勤治郎, 加治 順 : 農化, 28, 254(1954).	(1957).
(2) 小笠原長宏, 玉利勤治郎 : 本誌, 31, 390 (1957).	(7) 上坂一郎, 伊藤義昭 : <i>J. Antibiotics.</i> , 4, 418 (1951).
(3) 小笠原長宏, 加治 順, 玉利勤治郎 : 本誌, 31, 460 (1957).	(8) 斎藤達郎 : <i>J. Antibiotics</i> , 3, 709 (1950).
(4) 小野小三郎 : 北陸農試作物病害に関する研究成績 (夏作), 22 (1956).	(9) B. D. Davis : <i>Science</i> , 95, 78 (1949).
(5) 小笠原長宏, 玉利勤治郎 : 本誌, 31, 390 (1957).	(10) 玉利勤治郎, 加治 順 : 本誌, 31, 383(1957).
(6) 小笠原長宏, 玉利勤治郎 : 本誌, 31, 390	(11) 永久正志 : 酵素化学の進歩, 第 1 集 (共立出版), 9 (1949).
	(12) I. M. Klotz et al. : <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 74, 202, 209 (1952).

水稻の未熟な穀粒の搾汁によるトリプトファンの インドール酢酸への転換*

村上 浩, 林 武 (農業技術研究所生理遺伝部)

昭和 31 年 12 月 20 日 受理

植物組織の切片にトリプトファン (以下 TTP とす) を透過させるとオーキシンがつくられることが知られている。ホウレン草の葉よりえた酵素標品を用いて, Wildman 等⁽¹⁾は TTP よりインドール酢酸 (以下 IAA とす) の性質をもったオーキシンが生成することをアベナテストよりみとめ, この反応は TTP の酸化的脱アミノ反応によりインドールビルビン酸 (以下 IPA とす) が中間に生ずるものとした。著者は未熟な穀粒には強いトランスアミナーゼ作用のあることをみとめたので TTP の IAA への変化の中間段階としての IPA の生成にはこのトランスアミナーゼが役割を果しているものと考えてこの実験を行った。なお穀類の胚乳には比較的多く, IAA がふくまれているのでその生成をも考察した。

実験及び結果

材料 乳熟後期的水稻 (農林 8 号) の穀粒のみを採取し, 生体重の 2 倍の蒸溜水を加えて乳鉢中でホモジネートとし, 3,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離を行い, 上澄液を酵素液とした。

トランスアミナーゼ作用の検出 トランスアミナーゼの検出のために上述の酵素液を pH 7.5 の 0.1 M の磷酸塩緩衝液に 48 時間 5° で透析した後に使用した。アミノ基の供与体としては, グリシン, DL-アラニン, DL-セリン, DL-バリン, L-ロイシン, DL-メチオニン, L-トリプトファン, L-アスパラギン酸, L-アスパラギン, L-グルタミン酸を用い, アミノ基の受容体としては, ビルビン酸, α -ケトグルタル酸をそれぞれ使用した。何れも苛性ソーダにて pH 7.5 に中和した。アミノ酸溶液 (0.05 M) 0.5 ml, α -ケト酸溶液 (0.05 M) 0.5 ml に酵素液 0.5 ml を加え, 30° で 2 時間反応せしめた後に沸騰水中に 5 分間入れて反応を停止させ, 遠心分離を行い, 上澄液 0.01 ml を東洋濾紙 No. 50 に spot し, 一次元濾紙クロマトグラフィーにより含水フェノール (フェノール : 水 = 4 : 1) で展開し, 風乾後にニンヒドリンにて発色せしめ, グルタミン酸 ($R_F=0.2$) 及びアラニン ($R_F=0.58$) の発色の程度により, 各アミノ酸とケト酸との間のトランスアミナーゼ作用の有無を検した。その結果は第 1 表及び第 2 表の如くであり, グルタミン酸-アスパラギン酸トランスアミナーゼ, グルタミン酸-アラニントランスアミナーゼの活力が高い。他のすべてのアミノ酸とビルビン酸, 又は α -ケトグルタル酸とのトランスアミナーゼ作用も弱いながらみとめられ, TTP もトランスアミナーゼのアミノ基の供与体になりうる事がうかがわれた。したがって TTP より IPA が生成し, 更に IAA にかわりうる事が推定される。

TTP より IAA の生成 反応混合液の組成は次の如くである。(a) TTP 溶液 (0.05 M), (b) α -ケト酸溶

* The Conversion of Tryptophan to Indoleacetic Acid by the Sap of Immature Kernels of Rice Plants.

By Yutaka MURAKAMI and Takeshi HAYASHI (Section of Physiology and Genetics, National Institute of Agricultural Sciences)

第1表 アミノ酸と α -ケトグルタル酸とよりグルタミン酸の生成

アミノ酸	生成グルタミン酸の spot の比較値
DL-アラニン	卅
L-アスパラギン酸	卅
L-アスパラギン	土
グリシン	土
L-ロイシン	土
DL-メチオニン	土
DL-セリン	土
L-トリプトファン	土
DL-バリン	土
アミノ酸無	—

±の記号はグルタミン酸の spot ($R_F=0.2$) がつかにみとめられることを示す。

第2表 アミノ酸とピルビン酸とよりアラニンの生成

アミノ酸	生成アラニンの spot の比較値
L-アスパラギン酸	土
L-グルタミン酸	卅
グリシン	土
L-ロイシン	+
DL-メチオニン	土
DL-セリン	土
L-トリプトファン	土
DL-バリン	土
アミノ酸無	—

±の記号はアラニンの spot ($R_F=0.58$) がつかにみとめられることを示す。

発色する物質が少なくとも2種生ずるので、比色法による定量とアベナテストによる生物学的定量を行って生成を測定した。

i) 比色法：反応混液 0.5 ml に 0.2 ml の 5% トリクロール酢酸を加え遠心分離し、上澄液 0.5 ml について Salkowski 試薬により、Gordon & Weber⁽³⁾ の方法にしたがって次の如く定量した。即ち 0.5 ml の上澄液に 2 ml の蒸留水及び 2.5 ml の $\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$ 液 (1.0 ml の 0.5 M FeCl_3 を 35% HClO_4 100 ml に加える) を加え、室温で 10 分後に発色する赤色を島津光電比色計の 510 m μ のフィルターを用い既知の濃度の IAA を標準として比色した。

第4表 ピルビン酸の濃度と IAA 生成量との関係

ピルビン酸 M	IAA (比色法) $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$		
	30分	90分	210分
0	3	3	3
0.02	20	21.5	22
0.2	24.5	29	30
1	17	21	22

トリプトファンの濃度：0.0167 M

第5表 トリプトファンの濃度と IAA 生成量との関係

トリプトファン mM	IAA (比色法) $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$	
	30分	210分
0	0	0
1.7	7	7
8.3	11	12
16.7	15	18

ピルビン酸の濃度：16.7 mM

液 (0.05 M), (c) 酵素液, (a):(b):(c)=1:1:1, 反応温度 30°, 反応時間 90 分。反応混液を稀塩酸にて pH 3 とし、エーテルにて抽出し、この抽出物を東洋濾紙 No. 50 に spot し、イソプロピルアルコール：アンモニア：水=10:1:1 の混液で展開し、風乾後、Salkowski の試薬 ($\text{FeCl}_3\text{-HClO}_4$) にて発色せしめた。IAA に相当する R_F , 即ち約 0.3 附近以外に約 0.1 の場所にも赤橙色に発色するのがみられ、 R_F 値⁽²⁾ より IPA と推定される。したがって TTP より Salkowski の試薬により赤色に

第3表 トリプトファンと α -ケト酸とよりインドール酢酸の生成

	IAA (比色法) $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$	IAA (アベナテスト) $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$	TTP オーキシ ン (IAA) への転換 %
酵素液	0	0	—
酵素液+TTP	3	0.5	0.03
酵素液+TTP+ピルビン酸	21	4.2	0.25
酵素液+TTP+オキザル酢酸	18	—	—
酵素液+TTP+ α -ケトグルタル酸	14	2.4	0.14
TTP	0	0	—
TTP+ピルビン酸	0	0	—
酵素液+ピルビン酸	0	0	—
酵素液+オキザル酢酸	0	0	—
酵素液+ α -ケトグルタル酸	0	0	—

反応条件：トリプトファン (TTP) 16.7 mM (1700 $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$),
 α -ケト酸 16.7 mM

反応時間 90 分, 温度 30°, pH 7.5

転換% = $\frac{\text{IAA (アベナテスト)}}{1700} \times 100$

ii) アベナテスト：反応混液 0.5 ml に 1 N の塩酸 1 滴加え、遠心分離し、上澄液を 10 倍に稀釈し、その 0.2 ml に 2% 寒天 1 ml を加えて、Went のアベナテストを行い、既知の濃度の IAA の屈曲度と比較して IAA の量とした。

実験結果は第3表にまとめた如く、比色法及びアベナテストによっても α -ケト酸を加えた方が IAA の生成が多い。比色法がアベナテストよりも大きい値が出るのは Salkowski 試薬で発色す

第6表 ピルビン酸、ピリドキサルリン酸の効果

	IAA (比色法) $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$
酵素液+TTP	±
酵素液+TTP+ピリドキサルリン酸	±
酵素液+TTP+ピルビン酸	33
酵素液+TTP+ピルビン酸+ピリドキサルリン酸	40

酵素液：透析したもの トリプトファン (TTP): 0.02 M
ピルビン酸: 0.2 M ピリドキサルリン酸: 15 $\mu\text{g}/0.5 \text{ ml}$

る IAA 以外の化合物, 例えば IPA がアベナテストでは殆んど反応しないためであろう。なお Kögl & Kostermans⁽⁴⁾ は IPA のアベナテストによる作用力は IAA の約 1% であると報告している。TTP 及びビルビン酸の濃度の影響をみると第 4 表及び第 5 表の如く, これ等が増加するにしたがって Salkowski 試薬によって赤色になる物質の生成は増加する。しかし TTP の濃度が 16.7 mM の時にはビルビン酸の濃度が 1 M にもなると生成はかえって減少する。なお最適水素イオン濃度は 8 附近の弱アルカリ側にある。磷酸緩衝液にて透析した酵素液を用いてピリドキサール磷酸の効果をみると第 6 表の如く比色法により IAA の生成がやや増加した。

考 察

水稻の未熟な穀粒の搾汁は TTP より IAA を生成し, ビルビン酸, オキザル酢酸, α -ケトグルタル酸等の α -ケト酸を加えると生成が増加し, トランスアミナーゼが反応の一段階即ち IPA の生成に関与していると考えられる。しかし, 最もよい条件の時でも, アベナテストにより活性なオーキシン即ち IAA への転換は加えた TTP の約 0.5% であり, 生成は非常にわずかである。一方, 水稻の胚乳には酸性で沈澱する結合型の IAA が多量にふくまれており, 又玉蜀黍の未熟な胚乳には乾物重の 0.5% にも達する遊離の IAA があることが知られている⁽⁶⁾。著者の実験によると穀類の茎や葉より拡散によって抽出しうる IAA は殆んどない。それ故胚乳中の IAA は茎や葉より転流によって蓄積されたと考えるよりもむしろ胚乳中で何等かの母体よりつくられたものとした方がよいであろう。胚乳の IAA の Biogenesis の立場より考えれば, TTP が IAA の直接の母体であるとする, 上述の如く, あまりにも IAA への転換が少い故, TTP 以外の物質から直接 IAA の生成する道も検討する必要がある。

摘 要

未熟な水稻の穀粒の搾汁はトリプトファンより IAA を生成しうる。この作用はビルビン酸, オキザル酢酸, α -ケトグルタル酸等の α -ケト酸を加えることにより増加しトランスアミナーゼが生成の一段階に関与している。転換は加えたトリプトファンの 0.5% 以下で極めて少い。

- (1) S. G. Wildman, M. G. Ferrio, J. Bonner : *Arch. Biochem.*, 13, 131 (1947).
- (2) B. B. Stowe, K. V. Thimann : *Arch. Biochem. Biophys.*, 51, 449 (1954).
- (3) S. A. Gordon, R. P. Weber : *Plant Physiol.*, 26, 192 (1951).

- (4) F. Kögl, D. G. F. R. Kostermans : *Z. Physiol. Chem.*, 235, 201 (1935).
- (5) O. N. Hinsvark, W. M. H. Houff, S. H. Wittwer, H. M. Sell : *Plant Physiol.*, 29, 107 (1954).

ステロイドと微生物 (第 1 報)*

妊馬尿中のエストロゲンについて

黒 沢 雄 一 郎 (鶴見化学研究所)

昭和 31 年 12 月 22 日 受 理

緒 言

卵巢濾胞ホルモンである estrone は Doisy, Butenandt 等により妊婦尿から始めて結晶状に得られたのであるが, 更に妊婦尿中には estradiol, estriol も存在する事が認められ, 続いて Zondek は estrone の資源として妊馬尿は妊婦尿に比較して平均 10 倍の活性がある事を明かにした。尚妊馬尿中には estrone の外に equilin, dihydroequilin, equilenin, dihydroequilenin 及び α -estradiol が存在する事も認められた⁽¹⁻²⁾。之等 estrogens が尿中に排泄される際には大部分が sulfate 又は glucuronide の如き水溶性の結合態⁽³⁾となって排泄されるので, estrone の製造には先ず鉍酸で加熱加水分解を行い遊離態としてベンゼン, エーテルの如き有機溶媒で抽出を行なうが, 現在では原料妊馬尿に直接ベンゼンを加え酸分解と同時に抽出を行っている様である。併し加水分解と同時にホルモンの分解が起こると云われ, Smith 等は水溶液中で純 estrone は 100%, 20 分間の酸

* Steroids and Microbes. Part I. Studies on Estrogens of Mare Pregnancy Urine
By Yuichiro KUROSAWA (Tsurumi Chemical Research Institute, Tsurumi, Yokohama)