UDC 547.466.4' 581.2 : 576.851.132.095.3

155. 亀田幸雄, 豊浦悦子, 木村行男, 松井勝彦, 斎藤晴彦: 微生物に於ける

アンラーゼ能の研究 (第 3 報)

 ϵ -N-Benzoyllysine のアシル誘導体に対する土壌細菌 KT 84 のアンラーゼ能*

Yukio Kameda, Etsuko Toyoura, Yukio Kimura, Katsuhiko Matsui, and Haruyoshi

Saito: Studies on the Acylase Activities and Microorganisms. III.

Acylase Activity of Soil Bacteria KT 84 upon Acyl

Derivatives of ϵ -N-Benzoyllysine.

(Laboratory of Antibiotics, Faculty of Pharmacy, Kanazawa University.)

The acylase of soil bacteria KT 84 was extracted in a cell-free state and its cell-free acetone powder was prepared.

The bacterial mass, acetone-dried powder, cell-free extract, and cell-free acetone powder of KT 84 all effected asymmetric hydrolysis of α, ϵ -di-N-benzoyl- and α -N-acetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine affording ϵ -N-benzoyl-L-lysine and α, ϵ -di-N-benzoyl-D-lysine, and ϵ -N-benzoyl-L-lysine and α -N-acetyl- ϵ -N-benzoyl-D-lysine, respectively. The benzoyl derivative of ϵ -N-benzoyl-L-lysine was more easily hydrolysed than its acetyl derivative in this case.

Eleven kinds of α -N-acyl derivative of ϵ -N-benzoyl-DL-lysine were synthesized and hydrolytic action of cell-free extract of KT 84 was examined by ninhydrin colorimetry. The results showed that (1) *m*- and *p*-nitrobenzoyl, dichloroacetyl, and benzoyl derivatives were more easily hydrolyzed than other acyl derivatives; (2) *m*- and *p*-nitrobenzoyl derivatives were hydrolyzable but *o*-nitrobenzoyl was hardly hydrolyzed, while *p*-aminobenzoyl was far more resistant to hydrolysis than *p*-nitrobenzoyl derivative; (3) cinnamoyl and phenylacetyl derivatives are less hydrolyzable than benzoyl derivative; and that (4) chloroacetyl, acetyl, and formyl derivatives are much less hydrolyzable than dichloroacetyl derivative.

(Received January 22, 1958)

リジンは必須アミノ酸であり, その L 体のみが栄養上有効で D 体は無効といわれている. この L-リジンは多くの穀類とくに米, 小麦等ではその含有量が比較的少いので, L-リジンの添加により栄養価を高めることが問題となつている.

酵素によるリジンの光学的分割については, 豚の腎臓の acylase を Greenstein ら¹⁾は α, ϵ -di-N-chloroacetyl-DL-lysine に作用させて ϵ -N-chloroacetyl-L-lysine と α, ϵ -di-N-chloroacetyl-D-lysine とに分割しており, 内野等²⁾は α -N-chloroacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine に作用させて ϵ -N-benzoyl-L-lysine と α -N-chloroacetyl- ϵ -N-benzoyl-D-lysine に分割している.

さきに著者等は土壌細菌 KT 84 (*Pseudomonas* sp.)³⁾を用いてフェニルアラニン^{4,5)}, β -フェニルセリン⁶⁾, など 10 数種のアミノ酸の光学的分割を行つてきたが, 今回リジンの光学的分割に成功した. 基質としては α, ϵ -di-N-benzoyl-DL-lysine (I) 及び α -N-acetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (II) を用い, これに KT 84 の菌体浮遊液, アセトンパウダー, 無細胞抽出液, または無細胞アセトンパウダーを作用させて不斉水解を行い, それぞれ ϵ -N-benzoyl-L-lysine (III), α, ϵ -di-N-benzoyl-D-lysine (IV) 及び ϵ -N-benzoyl-L-lysine (III), α -N-acetyl- ϵ -N-benzoyl-D-lysine (V) を収量よく得ることが出来た. この際 ϵ -N-benzoyl-DL-lysine の acetyl 誘導体 (II) は benzoyl 誘導体 (I) に比しはるかに不斉水解され難く, 原料の一部を回収した.

* 一部は日本薬学会例会発表 (1954 年 11 月).

1) J. P. Greenstein, J. B. Gilbert, P. J. Fodor: J. Biol. Chem. **182**, 451(1950).2) 内野, 米谷: Chem. Ber. **85**, 860(1952).3) Y. Kameda, E. Toyoura: 本誌 **72**, 791(1952).4) Y. Kameda, E. Toyoura, H. Yamazoe, Y. Kimura, Y. Yasuda: Nature **170**, 888(1952).5) 亀田, 豊浦, 木村, 松井, 堀田: 本誌 **78**, 748(1958).6) 亀田, 豊浦, 木村, 松井, 川崎: 本誌 **78**, 754(1958).

次に著者等は ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) の α -N-アシル誘導体 11 種 (formyl, acetyl, chloroacetyl, dichloroacetyl, benzoyl, *o*-nitrobenzoyl, *m*-nitrobenzoyl, *p*-nitrobenzoyl, *p*-aminobenzoyl, phenylacetyl, cinnamoyl 誘導体) について KT 84 無細胞抽出液による被水解性を比較測定した (Table I). この実験では基質としてラセミ型を使用したが生、KT 84 は 20 数種のアミノ酸の N-アシル誘導体に対しその L 型のみを水解し D 型を水解せず⁴⁻¹⁰⁾, また上記の如く ϵ -N-benzoyl-DL-lysine の α -N-benzoyl 及び α -N-acetyl 誘導体についても KT 84 は L 型のみを水解するので、ここで水解されたのは L 型のみであると考えられる。

Table I. Rate of Hydrolysis with Cell-free Extract of KT 84

Substrate	Rate* of hydrolysis	Substrate	Rate* of hydrolysis
$\text{C}_6\text{H}_5\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{-CH-COOH}$	with KT 84	$\text{C}_6\text{H}_4\text{CONH}(\text{CH}_2)_4\text{-CH-COOH}$	with KT 84
NH-R	($\mu\text{M/h./mg. N}$)	NH-R	($\mu\text{M/h./mg. N}$)
R= HCO-	$\ll 1$	R= <i>o</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -CO-	$\ll 1$
CH ₃ CO-	3.1	<i>m</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -CO-	268
ClCH ₂ CO-	25.2	<i>p</i> -NO ₂ -C ₆ H ₄ -CO-	250
Cl ₂ CHCO-	150	<i>p</i> -NH ₂ -C ₆ H ₄ -CO-	19.5
C ₆ H ₅ CO-	148	C ₆ H ₅ CH ₂ CO-	$\ll 1$
		C ₆ H ₅ -CH=CH-CO-	12.5

* In terms of micromoles of substrate hydrolyzed at 38° per hour per mg N. Digests composed of 0.5 cc. of enzyme solution, 1 cc. of phosphate buffer at pH 7.8, and 0.5 cc. of neutralized 0.05 M racemic substrate.

Table I の結果から、(1) *m*-nitrobenzoyl, *p*-nitrobenzoyl, dichloroacetyl, benzoyl 基が他のアシル基に比べて非常に水解されやすいこと、(2) *m*-nitrobenzoyl, *p*-nitrobenzoyl 基は非常に水解されやすいが *o*-nitrobenzoyl 基は殆んど水解されず、また *p*-aminobenzoyl 基は *p*-nitrobenzoyl 基よりも著しく水解され難いこと、(3) benzoyl 基に比べて cinnamoyl 及び phenylacetyl 基は遙かに水解され難く、(4) dichloroacetyl 基に比べて chloroacetyl, acetyl, formyl 基は非常に水解され難いことが考察される。

水解作用の試験法を教示していただいた武田薬品工業株式会社研究所大村栄之助博士並びに元素分析を担当された当薬学部板谷芳京氏に深謝する。本研究費の一部は昭和 31 年文部省科学試験研究費を仰いだのでここに記して感謝の意を表する。

実 験 の 部

ϵ -N-Benzoyl-DL-lysine (VI) カプロラクタムを水解、ベンゾイル化し、 α 位を Br 化、次いでアミノ化して合成¹¹⁾。水より再結晶。白色結晶, mp 265°(decomp). 次の合成の原料としては粗製品をそのまま用いることが出来る。

α -N-Formyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 10 g を 80% HCOOH 90 cc に溶解、これに Ac₂O 13 cc を加え室温に 20 時間放置。水 25 cc を加え減圧下に乾固、残留物に EtOH 100 cc を加え温浸、不溶物を濾去、EtOH 溶液は減圧下に乾固、残留物を水より再結晶。白色柱状晶, mp 168~169°. 得量 3.7 g (収率 33.4%). C₁₄H₁₉O₄N₂ (α -N-formyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 60.42, H 6.52, N 10.07, 実験値 C 60.65, H 6.72, N 9.95.

α -N-Acetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (II) (VI) 5 g に水酢 20 cc 及び Ac₂O 3 cc を加え、水浴上で 1 時間加熱溶解後溶媒を減圧下に留去、残留物を水より再結晶。白色針状晶, mp 142~143°. 得量 3.8 g (収率 64.8%). C₁₅H₂₀O₄N₂ (α -N-acetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 61.63, H 6.90, N 9.58, 実験値 C 61.76, H 7.24, N 9.71.

- 7) 亀田, 豊浦, 木村, 金谷, 野田: 本誌 78, 763(1958).
- 8) 亀田, 豊浦, 木村, 金谷, 吉村: 本誌 78, 765(1958).
- 9) 亀田, 豊浦, 木村, 金谷, 石川, 吉村: 本誌 78, 767(1958).
- 10) 亀田, 豊浦, 松井, 木村, 金谷, 中谷, 斉藤, 川瀬: 本誌 78, 769(1958).
- 11) Org. Syntheses 19, 18, 20, 61(1939).

α -N-Chloroacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g を 2N NaOH 25 cc に溶解し, 冷却振盪しながら chloroacetyl chloride 2.3 g を少しずつ加える. 約 30 分振盪後 HCl 酸性, AcOEt 抽出, AcOEt を留去後残留物を Me_2CO ・ベンゼンより再結晶. 白色板状晶, mp 134~135°. 得量 3.0 g (収率 46%). $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}$ (α -N-chloroacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 55.20, H 5.83, N 8.59, 実験値 C 55.31, H 6.09, N 8.62.

α -N-Dichloroacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g と dichloroacetyl chloride 2.9 g より α -N-chloroacetyl 体と同様に合成. 水より再結晶. 白色板状晶, mp 147~148°. 得量 4.7 g (収率 43.6%). $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{N}_2\text{Cl}_2$ (α -N-dichloroacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 49.87, H 4.99, N 7.75, 実験値 C 50.06, H 5.03, N 7.81.

α, ϵ -Di-N-benzoyl-DL-lysine (I) (VI) 5 g を N NaOH 25 cc に溶解し, 冷却振盪しながら benzoyl chloride 2.8 g 及び N NaOH 25 cc を少しずつ交互に加える. 加え終つて約 30 分振盪後 HCl 酸性, 析出物を濾取, 乾燥後 Et_2O で安息香酸を抽出. Me_2CO より再結晶. 白色板状晶, mp 144~145°. 得量 4.5 g (収率 63.4%). $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$ (α, ϵ -di-N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 67.78, H 6.26, N 7.91, 実験値 C 67.65, H 6.32, N 8.05.

α -N-*o*-Nitrobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g と *o*-nitrobenzoyl chloride (*o*-nitrobenzoic acid 3.4 g に SOCl_2 10 g を作用させて合成した粗製品) より (I) と同様にして合成. Et_2O で *o*-nitrobenzoic acid を抽出後 EtOH より再結晶. 白色結晶, mp 110~120°. 得量 3.3 g (収率 41.3%). 本品には *p*-体が少量混在していると思われる.

α -N-*m*-Nitrobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g と *m*-nitrobenzoyl chloride 3.8 g より (I) と同様にして合成. Et_2O で *m*-nitrobenzoic acid を抽出後 EtOH より再結晶. 白色板状晶, mp 193~194°. 得量 4.2 g (収率 52.5%). $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_3$ (α -N-*m*-nitrobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 60.14, H 5.30, N 10.52, 実験値 C 60.02, H 5.42, N 10.63.

α -N-*p*-Nitrobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g と *p*-nitrobenzoyl chloride 3.8 g より (I) と同様にして合成. Et_2O で *p*-nitrobenzoic acid を抽出後, 60% AcOH より再結晶. 白色針状晶, mp 223~224°. 得量 5.4 g (収率 67.5%). $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}_3$ (α -N-*p*-nitrobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 60.14, H 5.30, N 10.52, 実験値 C 60.18, H 5.43, N 10.45.

α -N-*p*-Aminobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine α -N-*p*-nitrobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine 4 g を米酢酸 100 cc に加温して溶解, Pd-C を触媒として加温しながら常圧接触還元. 理論量の H_2 を吸収したなら濾過, 濾液を約 20 cc に濃縮. Et_2O を加えて氷室に放置すると微黄色結晶を析出. dil AcOH より再結晶. 白色針状晶, mp 160~161°. 得量 1.8 g (収率 49.0%). $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}_3$ (α -N-*p*-aminobenzoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 65.02, H 6.28, N 11.38, 実験値 C 65.10, H 6.27, N 11.56.

α -N-Phenylacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g, phenylacetyl chloride 3.1 g より (I) と同様にして合成. Me_2CO より再結晶. 白色板状晶, mp 150~151°. 得量 3.7 g (収率 50.3%). $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$ (α -N-phenylacetyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 68.46, H 6.57, 実験値 C 68.45, H 6.55.

α -N-Cinnamoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine (VI) 5 g cinnamoyl chloride 3.6 g より (I) と同様にして合成. Me_2CO より再結晶. 白色針状晶, mp 180~181°. 得量 4.7 g (収率 61.8%). $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{N}_2$ (α -N-cinnamoyl- ϵ -N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 69.45, H 6.36, 実験値 C 69.51, H 6.40.

KT 84 無細胞抽出液の調製 内容 500 cc の培養フラスコ 10 個にブイオン (pH 7.2) 200 cc を入れ, 滅菌後 KT 84 をうえ 25° に 3~4 日間培養. 遠心分離 (3,000 g 30 分) により集菌, 蒸留水で 2 回洗浄, 菌体を濾紙の上に薄く拡げて水分を切る. 菌の重量 13~17 g. これをあらかじめ氷室中で充分冷却した乳鉢に入れ, アルミナ (近畿研磨材 K.K. WA 800) 26~34 g (菌の重量の 2 倍) と混和し菌体をすりつぶす. 20 分間磨砕した後蒸留水 40 cc を加えかきまぜて均一にして一時間氷室に放置, 遠心分離 (3,000 g 20 分) によりアルミナを除き, 更に高速遠心分離 (25,000 g 30 分) により菌体の破片を除き澄明な KT 84 無細胞抽出液 40 cc を得.

KT 84 無細胞アセトンパウダーの調製 上記無細胞抽出液を少量の AcOH で pH 4.5 に調節し析出物を遠心分離 (3,000 g 20 分) により集め, 少量の水と乳鉢中で混和した後 -5° に冷却した Me_2CO の中へかきまぜながら少量ずつ加える. 加え終つた後 5 分間攪拌, 吸引濾取, 冷 Me_2CO , 次いで冷 Et_2O で洗い濾紙の上に圧して Et_2O を除き, デシケーター中で減圧乾燥. KT 84 無細胞アセトンパウダー 0.7 g を得.

KT 84 菌体浮遊液による α, ϵ -di-N-benzoyl-DL-lysine (I) の不斉水解 (I) 8.85 g に水 500 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調製. これに KT 84 湿菌体約 7 g とトルエン 5 cc を加え 37° に 2 日間放置. 遠心分離 (3,000 g 30 分) により菌体を除去, AcOH で pH 4.5 とし減圧下に濃縮し約 50 cc とする. HCl 酸性にして析出せる結晶を吸濾, 濾液は AcOEt で抽出し水層と AcOEt 層にわけ, 結晶は Me_2CO で抽出. 水層は一旦減圧下に乾固した後残留物を少量の水にとし NH_4OH で中和, 析出せる結晶を水より再結晶. 白色葉状晶, mp 270~272°(decomp). $[\alpha]_D^{25} : +19.5^\circ$ (c=2, 5N HCl). 得量 2.45 g (収率 78.5%). $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_2$ (ϵ -N-benzoyl-L-lysine) 計算値 C 62.38, H 7.25, N 11.19, 実験値 C 62.51, H 7.45, N 11.20.

Me_2CO 抽出液及び AcOEt 層はそれぞれ溶媒を留去, 残留物を共に石油エーテルと処理して安息香酸を除き Me_2CO ・ベンゼンより再結晶. 白色葉状晶, mp 144~145°. $[\alpha]_D^{25} : +7.5^\circ$ (c=2, EtOH). 得量 2.92 g (収率 66%). $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{N}_2$ (α, ϵ -di-N-benzoyl-DL-lysine) 計算値 C 67.78, H 6.26, N 7.91, 実験値 C 67.81, H 6.42, N 7.97.

石油エーテル溶液より安息香酸 mp 118~120° の白色板状品 1.18 g (収率 77.8%) を得.

KT 84 アセトンパウダー⁵⁾ による α, ϵ -di-*N*-benzoyl-DL-lysine (I) の不斉水解 (I) 3.5 g に水 200 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節. これに KT 84 アセトンパウダー 0.4 g 及びトルエン 2 cc を加え 37° に 2 日間放置. 菌体浮遊液を作用させた場合と同様に処理して ϵ -*N*-benzoyl-L-lysine (III) 白色葉状品, mp 270~272°(decomp). $[\alpha]_D^{20}$: +19.5° (c=2, 5*N* HCl). 0.95 g (収率 76.3%). α, ϵ -di-*N*-benzoyl-D-lysine (IV) 白色葉状品, mp 144~145°. $[\alpha]_D^{20}$: +7.5° (c=2, EtOH). 1.17 g (収率 66.5%). 及び安息香酸 mp 118~120°. 0.48 g (収率 78.7%) を得.

KT 84 無細胞アセトンパウダーによる α, ϵ -di-*N*-benzoyl-DL-lysine (I) の不斉水解 (I) 8.85 g に水 500 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節. KT 84 無細胞アセトンパウダー 0.35 g 及びトルエン 5 cc を加え 37° に 2 日間放置. AcOH で pH 4.5 にして減圧濃縮, 菌体浮遊液の場合と同様に処理して水層より ϵ -*N*-benzoyl-L-lysine (III) 白色葉状品, mp 270~272°(decomp). $[\alpha]_D^{20}$: +19.5° (c=2, 5*N* HCl). 2.45 g (収率 78.8%) を得. $C_{13}H_{18}O_3N_2$ 計算値 C 62.38, H 7.25, N 11.19, 実験値 C 62.45, H 7.38, N 11.35.

Me_2CO 抽出液及び AcOEt 層より α, ϵ -di-*N*-benzoyl-D-lysine (IV) 白色葉状品, mp 144~145°. $[\alpha]_D^{20}$: +7.5° (c=2, EtOH). 2.93 g (収率 66.3%) を得. $C_{20}H_{22}O_4N_2$ 計算値 C 67.78, H 6.26, N 7.91, 実験値 C 67.65, H 6.39, N 8.05. 石油エーテル溶液より安息香酸 mp 118~120° の白色板状品 1.25 g (収率 82.5%) を得.

KT 84 無細胞抽出液による α, ϵ -di-*N*-benzoyl-DL-lysine (I) の不斉水解 (I) 3.5 g に水 200 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節. これに KT 84 無細胞抽出液 8 cc 及びトルエン 2 cc を加え 37° に 2 日間放置. KT 84 菌体浮遊液を作用させた場合と同様に処理して ϵ -*N*-benzoyl-L-lysine (III). 白色葉状品, mp 270~272°(decomp). $[\alpha]_D^{20}$: +19.5° (c=2, 5*N* HCl). 0.99 g (収率 79.2%). α, ϵ -di-*N*-benzoyl-D-lysine (IV). 白色葉状品, mp 144~145°. $[\alpha]_D^{20}$: +7.5° (c=2, EtOH). 1.20 g (収率 68.8%). 及び安息香酸 mp 118~120°. 0.45 g (収率 73.7%) を得.

KT 84 無細胞抽出液による α -*N*-acetyl- ϵ -*N*-benzoyl-DL-lysine (II) の不斉水解 (II) 13.8 g に水 190 cc を加え NaOH で溶解し pH 7.2 に調節. これに KT 84 無細胞抽出液 40 cc 及びトルエン 5 cc を加え 37° に放置. 2 日及び 3 日後に析出せる結晶を遠心分離 (3,000 *g* 20 分) により分離, 4 日後には結晶が出ていなかった. AcOH で pH 4.5 とし減圧下に濃縮, HCl 酸性にして AcOEt で抽出, 水層と AcOEt 層にわけ. 水層を NH_4OH で中和して析出せる結晶をさきに遠心分離した結晶と合せ水より再結晶. ϵ -*N*-benzoyl-L-lysine (III) 白色葉状品, mp 270~272°(decomp). $[\alpha]_D^{20}$: +19.5° (c=2, 5*N* HCl). 3.4 g (収率 52.7%) を得.

AcOEt 層は溶媒を留去. 残留物を Me_2CO ・ベンゼンより再結晶. α -*N*-acetyl- ϵ -*N*-benzoyl-D-lysine (V) 白色結晶, mp 122°. $[\alpha]_D^{20}$: -6.5° (c=2, EtOH). 0.9 g (収率 13.0%). 及び α -*N*-acetyl- ϵ -*N*-benzoyl-DL-lysine (II) mp 141~142°, $[\alpha]_D^{20}$: 0° (c=2, EtOH) 1.5 g を得.

水解作用の試験 (試薬) (1) クエン酸緩衝液: クエン酸 21.008 g を *N* NaOH 溶液 200 cc に溶解, 水を加えて 500 cc とし, これに防腐剤として約 0.2 g のチモールを加える. これで pH 5.0 の緩衝液が得られる.

(2) ニンヒドリン試薬 A: ニンヒドリン 0.4 g を methylcellosolve (ethyleneglycol monomethyl ether) 10 cc に溶解. B: 新たに調製した塩化第一錫 $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.14 g をクエン酸緩衝液 (pH 5.0) 10 cc に溶解する. その 1 cc をとり 9 cc のクエン酸緩衝液を加えて 10 cc とする.

A に B を加えてニンヒドリン試薬とする.

(3) 12%トリクロロ酢酸

(4) 希釈液 $PrOH \cdot H_2O$ (1:1) の混合液.

(5) 0.1 *M* 磷酸緩衝液 (pH 7.8)

(6) *N* NaOH

(7) 0.1 *M* Na_2HPO_4 溶液

水解されたアミノ酸をニンヒドリンで呈色させ, その吸光密度から各基質の水解された量を定量した¹²⁾. 即ち基質の 0.05 *M* 溶液を pH 7.8 に調節. その 0.5 cc を試験管にとり KT 84 無細胞抽出液の一定量と磷酸緩衝液 (pH 7.8) を加え全量 2 cc とする. この際 1 時間に水解される基質の量が 30%以内になるように酵素量を加減する. 37° に 1 時間放置した後 12%トリクロロ酢酸 2 cc を加えて酵素作用を停止せしめ, 約一時間放置後 1 回過, 1 回過 0.4 cc を別の試験管にとり *N* NaOH 0.1 cc 及び 0.1 *M* Na_2HPO_4 溶液 0.5 cc を加え全量 1 cc とする. その 0.2 cc をとり, ニンヒドリン試薬 1 cc を加え 15~20 分間沸騰水浴上で加熱, 冷後希釈液 (2~5 cc) で適当にうすめ 30 分放置後光电比色計を用いて 570 m μ の波長で吸光密度を測定する†.

また同時に 0~0.25 μM /0.2 cc を含有する標準溶液をつくり, この 0.2 cc にニンヒドリン試薬 1 cc を加えて 15~20 分間沸騰水浴上で加熱, 冷後前と同一の割合に希釈液を加え 30 分放置後 570 m μ の波長で吸光密度を測定し, 濃度一吸光密度間の標準曲線を作り, 水解されたアミノ酸の量を求める. KT 84 無細胞抽出液の蛋白量は銅-Folin 呈色法¹³⁾ で定量する.

金沢大学薬学部

12) S. Moore, W. H. Stein: J. Biol. Chem. **176**, 367(1948).

† 酵素液のみを incubate 後基質を加え発色させた液を対照におく.

13) O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Forr, R. T. Randall: J. Biol. Chem. **193**, 265(1951).